

08/973303



PRIORITY DOCUMENT

Bescheinigung

02 JUN 1997
PCT

Die GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH in Oberschleißheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen"

am 28. März 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 9. Mai 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Nietiedt

Patenzzeichen: 196 12 463.8

REINHARD · SKUHRA · WEISE & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

Deutsches Patentamt
Zweibrückenstraße 12

80297 München

REINHARD · SKUHRA · WEISE & PARTNER
PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
DR. WERNER BEHNISCH
FRIEDRICHSTRASSE 31
D-80801 MÜNCHEN
POSTFACH 44 0161
D-80750 MÜNCHEN
TELEFON 089 3816100
TELEX 6212339 sar d
TELEFAX 089 3401479

hr Zeichen: your ref

Unser Zeichen: your ref

Datum: date

P7996
Dr.B/cl

28. März 1996

Anmelder:
GSF-Forschungszentrum für
Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1, Neuherberg
85764 Oberschleissheim

Neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen

Die Erfindung betrifft ein neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität, das aus Säugetierzellen, insbesondere dem Kulturüberstand von Säugetierzellen, isolierbar ist. Das Protein ist insbesondere aus murinen und menschlichen Zellen isolierbar.

Im Kulturüberstand einer murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinie (WEHI-3) wurde eine Aktivität gefunden, die erythroide Zellen der Maus (Friend-Erythroleukämiezelllinien) zur Differenzierung unter Hämoglobinsbildung induziert. Das Molekulargewicht dieser Aktivität liegt zwischen etwa 10 und 60 kDa, so daß verschieden große Proteinspezies oder Aggregate der Aktivität anzunehmen sind. Die Expression der Aktivität ist abhängig von einem bislang nicht charakterisierten Serumfaktor, der sich in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Chargen von kommerziellem foetalen Kälberserum findet. Eine bezüglich der

Wirkung identische Aktivität wurde auch im Überstand bestrahlter humaner Knochenmarkstromazellen (Zelllinie L88 5) gefunden. Die Aktivität erhielt die vorläufige Bezeichnung EDA (Erythroid Differentiation Activity), obwohl auch andere als erythropoese-induzierende Funktionen aus dem Expressionsmuster des zugehörigen Gens abgeleitet werden können (siehe unten). Auf die menschliche Leukämiezelllinie K562 konnte ebenfalls ein Erythropoese-induzierender Effekt von EDA nachgewiesen werden (Spezies-übergreifende Wirkung von EDA).

Durch Expressionsklonierung wurde eine kleine RNA-Spezies des Gens nach Umschreiben in cDNA (DY-8) isoliert, die nach Transfektion in Cos-1 Zellen zu einem Kulturüberstand führte, der EDA-Aktivität hatte. Mit dieser 720 bp großen cDNA als Sonde wurde ein größeres cDNA-Stück mit 1.350 bp isoliert (HA-15/2), das bei temporärer Expression in Cos-1-Zellen und Verwendung des Cos-1-Überstandes ebenfalls eine schwache EDA-Wirkung aufwies. Das zu patentierende Gen wird in den untersuchten Zellen der Maus in verschiedenen RNA-Spezies (wahrscheinlich Spleißvarianten) von ca. 800, 1.200, 1.350, 1.750 und 2.200 bp exprimiert. Eine eda mRNA Expression in teilweise sehr geringem Umfang ließ sich in allen untersuchten Geweben nachweisen (Leber, Niere, Hirn, Darm, Plazenta). Die stärkste Expression findet sich im Thymus, gefolgt von foetaler Leber, adulter Milz und Knochenmark. Viele hämopoetische Zelllinien der Maus, besonders leukämisch transformierte wie DA-3, WEHI-3, NFS-60 oder NFS-61, aber auch nicht leukämisch transformierte wie NIH-3T3 oder TS1-C3, zeigen auf RNA-Ebene eine teilweise sehr starke Expression von eda.

Die Untersuchung der Bedeutung von eda in normalen Milzzellen der Maus ergab, daß eine mitogene oder T-Zellrezeptor-spezifische Stimulation der Zellen oder eine Stimulation der Protein-kinase C zu keiner stabilen Expression des Gens führt. Hingegen

kommt es zu einer stabilen Expression, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämmen CBA und C57Bl6 durchgeführt wird. Die hieraus ableitbare Bedeutung einer Beteiligung an der allogenen Reaktion der Milzzellen wurde durch ein semiallogenes Transplantationsmodell der Maus (C57Bl6-Milzzellen in letal bestrahlte CBAxC57Bl6 Mäuse injiziert) unterstrichen. In den Milzen der Versuchstiere kam es im Verlaufe der akuten "Graft-versus-Host"-Erkrankung im Vergleich zu denen der gewebeverträglich transplantierten Kontrollen zu einem etwa 7-fachen Anstieg der eda-Expression.

In allen Versuchen zeigt die 2,2 kbp Bande der eda-mRNA das konstanteste Expressionsmuster. Ihr struktureller Aufbau, analysiert an NIH-3T3 Zellen, ist in Abb. 18 wiedergegeben. Die Repeat-Strukturen sind ein wichtiges Charakteristikum der eda cDNA. Die zugehörige Sequenz, eine Konsensussequenz aus Klonen der WEHI-3 und der NIH-3T3 Zelllinien, ist in Abb. 17 wiedergegeben, die SEQ ID NO:1 entspricht. Alle mRNA Spezies, also die 800, 1.200, 1.350, 1.750 und 2.200 bp Banden, haben ein identisches 3'-Ende, in Abb. 18 als "Tail" bezeichnet und einen nur kurzen Banden-spezifischen 5'-Teil. Die Erythropoese-Differenzierungs-induzierende Wirkung wurde mit dem Klon DY-8 gefunden, der ca. 640 bp des 3'-Bereichs von eda und dazu ca. 75 bp eines eigenen 5'-Endes (Abb. 19 entspricht SEQ ID NO:2) enthält. Damit ist die Differenzierungs-induzierende Funktion zumindest teilweise an den 3'-Teil der cDNA gebunden.

Vergleiche der Bandengrößen der verschiedenen eda mRNA Spezies in unterschiedlichen Mausstämmen wie Balb/c, C3H, CBA, C57Bl6, Swiss, AKR oder NFS sowie von Teilsequenzen der eda cDNA von unterschiedlichen Mausstämmen lassen eine Mausstamm-abhängige Variabilität erkennen. Diesem Gen kommt somit wahrscheinlich eine Bedeutung für die Histokompatibilität zu. Die starke

Expression von eda in einigen Tumorzelllinien der Maus läßt eine Bedeutung für das Tumorstadium erwarten.

Obwohl eda in vielen Zelllinien exprimiert wird, findet man in den Kulturüberständen von nur ganz wenigen Zelllinien EDA-Aktivität. Die presumptiv verschiedenen Proteinspezies sind demzufolge im Regelfall mit den Zellen verankert. Eine Funktion an der Zelloberfläche im Rahmen spezifischer Zell-zu-Zell-Interaktionen (Differenzierungs-Induktion, allogene Reaktion) ist beim derzeitigen Stand der Untersuchungen zu vermuten.

Mit Hilfe der murinen eda Probe HA-15/2 gelang es, ein entsprechendes menschliches Gen sowohl auf DNA-Ebene durch Southern Blot Analyse unter stringenten Bedingungen, als auch auf RNA-Ebene durch Northern Blot Analyse nachzuweisen. Hierbei war insbesondere die Jurkat-Zelllinie positiv. Außerdem wurde eine deutliche Bande von ca. 1.100 bp bei einem Fall von menschlicher chronischer T-Zell-Leukämie vom T-Helferzelltyp gefunden, die in keiner anderen von 8 Proben von menschlichen Zelllinien und primärem menschlichen Knochenmarkmaterial erkennbar war. Wenn auch die ätiologische Bedeutung dieses Befundes einer weiteren Klärung bedarf, eröffnet dieser Befund die Möglichkeit eines therapeutischen und diagnostischen Einsatzes von Werkzeugen bei bestimmten Formen von Malignomen des Menschen, die auf Grund der in dieser Mitteilung enthaltenen Daten entwickelbar sein werden.

Es war eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität, insbesondere für erythropoetische Zellen, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch die Bereitstellung des Proteins mit differenzierungsinduzierender Aktivität mit den nachfolgenden Eigenschaften gelöst:

- a) isolierbar aus murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinien;
- b) isolierbar aus bestrahlten humanen Knochenmarkstromazellen;
- c) induziert Differenzierung in Friend-Erythroleukämiezelllinien unter Hämoglobinbildung;
- d) mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 10 - 60 kDa;
- e) induzierbar durch einen im fötalen Kälberserum vorkommenden Serumfaktor;
- f) mit einer Expression der zugehörigen mRNA in primären Zellen aus Thymus, foetaler Leber, adulter Milz oder Knochenmark;
- g) mit einer stabilen Expression der zugehörigen mRNA in vitro, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämme CBA und C57Bl6 durchgeführt wird;
- h) mit charakteristischen Repeat-Strukturen in der für das Protein kodierenden cDNA;
- i) mit AT-reichen Abschnitten in der für das Protein kodierenden cDNA;
- k) mit zugehörigen mRNA-Spezies unterschiedlicher Größe, die aus gleichen 3'-Bereichen, aber unterschiedlichen 5'-Bereichen bestehen.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein ist aus Säugetierzellen, bevorzugt aus dem Überstand von Säugetierzellkulturen, isolierbar. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird es aus murinen oder humanen Zellen isoliert. Bevorzugte Zelllinien sind: die murine myelomonozytäre leukämische Zelllinie WEHI-3, ATCC TIB68 und die bestrahlte humane Knochenmarkstromazelllinie L88/5, DSM ACC 2056. Die Friend-Erythroleukämiezelllinien F4N oder B8/3 dienen zum Nachweis des Proteins.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein besitzt zumindest eine Aminosäureteilsequenz, die von einer mit der cDNA der SEQ ID NO:1 oder NO:2 hybridisierenden DNA kodiert wird. Die Hybridisierung erfolgt bevorzugt unter stringenten Bedingungen.

Stringente Bedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind als solche Bedingungen definiert, die eine selektive und nachweisbare spezifische Bindung der Nukleinsäure an das für das erfindungsgemäße Protein kodierende Gen oder Transkripte des für das erfindungsgemäße Protein kodierenden Gens ermöglichen. Eine derartige Hybridisierung unter stringenten Bedingungen bedeutet vorzugsweise, daß nach einer Hybridisierung bei 65°C in einer wäßrigen Lösung oder bei 42°C in 50% Formamid und anschließendem Waschen des Filters bei 60°C in einer wäßrigen Lösung mit einer Salzkonzentration von 15 mM NaCl und einer SDS-Konzentration von 0,1% noch eine Bindung der Sonde an das für das erfindungsgemäße Protein kodierende Gen oder der hiervon abgeleiteten RNA nachweisbar ist. Bei Verwendung von kürzeren Nukleinsäuren als Sonden kann es jedoch erforderlich sein, weniger drastische Hybridisierungs- und/oder Waschbedingungen zu verwenden.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Teile, Analoga und Derivate des erfindungsgemäßen Proteins sowie Fusionsproteine mit umfaßt. Das erfindungsgemäße Protein liegt bevorzugt in im wesentlichen gereinigter und nativer Form oder in im wesentlichen rekombinanter Form vor.

Das erfindungsgemäße Protein weist eine differenzierungsinduzierende Aktivität für erythropoetische Zellen auf. Es ist jedoch aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse davon auszugehen, daß diese differenzierungsinduzierende Aktivität nicht nur für erythropoetische Zellen, sondern auch für andere Zellen zutrifft.

Es wurde erfindungsgemäß gefunden, daß das bereitgestellte Protein einen erythropoeseinduzierenden Effekt auf die menschliche Leukämiezelllinie K 562 (ATCC Nr. CRL243) aufweist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt DNA-Fragmente gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2, Teile, Derivate und Analoga hiervon und DNA-Fragmente, Teile, Analoga und Derivate hiervon, die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2, bevorzugt unter stringenten Bedingungen, hybridisieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch DNA-Fragmente, die zumindest für einen Teil eines Polypeptids kodieren, welches die Aktivität des menschlichen oder murinen Proteins mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung besitzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Vektoren, die eine DNA-Sequenz enthalten, die einem Gen oder einem DNA-Fragment entspricht, das für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen gemäß der Erfindung kodiert. Bei den erfindungsgemäßen Vektoren kann es sich um übliche, aus dem Stand der Technik bekannte Vektoren handeln, beispielsweise bakterielle Plasmide, Bakteriophagen oder virale Vektoren.

Die Erfindung umfaßt weiterhin Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäß bereitgestellten Vektor transformiert sind. Bei den Wirtszellen kann es sich um Prokaryonten- oder Eukaryontenzellen, beispielsweise E.coli-Zellen oder Hefezellen, handeln.

Die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2, Teile, Derivate oder Analoga hiervon, werden erfindungsgemäß beispielsweise dadurch erhalten, daß eine menschliche oder murine cDNA-Klonbank unter Verwendung eines DNA-Fragments

einer DNA, die für ein murines oder menschliches Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität kodiert, gescreent wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin monoklonale oder polyklonale Antikörper, die gegen das erfindungsgemäße Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen, einem Teil, einem Derivat oder einem Analogon hiervon gerichtet sind.

Erfindungsgemäß wird weiterhin ein therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel bereitgestellt, das als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure in einer wirksamen Menge enthält, die mit einem Gen oder einem Teil hiervon hybridisiert, und das für das erfindungsgemäße Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen kodiert.

Erfindungsgemäß bereitgestellt wird auch ein therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) die für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil hiervon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) und/oder (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleotidsequenz aus (a), (b) und/oder (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt. Die Nukleinsäure des Mittels ist eine ggf. modifizierte DNA oder RNA.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte therapeutische Mittel enthält das Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen der vorliegenden Erfindung, ein Analogon, Derivat oder Teile hiervon zusammen mit üblichen

Träger- und/oder Hilfsstoffen in einer wirksamen Menge.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte therapeutische, diagnostische oder experimentell nutzbare Mittel ist beispielsweise als molekulare Sonde in der Diagnostik oder als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression einsetzbar. Durch Verwendung von Antikörpern gegen dieses Mittel kann therapeutisch, diagnostisch oder experimentell Einfluß auf die differenzierungsinduzierende Wirkung genommen werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Transformation einer Prokaryonten- oder Eukaryontenzelle unter Verwendung einer DNA, die für das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein mit erythropoeseinduzierender Aktivität kodiert, sowie Teile, Derivate oder Analoga dieser DNA.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Fusionsprotein mit einer Aminosäuresequenz, die in ihrer Gesamtheit oder zum Teil aus der Aminosäuresequenz von menschlichem oder murinem Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen gemäß der Erfindung und einem Teil eines prokaryontischen oder eukaryontischen Proteins besteht.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein synthetisches Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen gemäß der Erfindung mit einer Aminosäuresequenz, die von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die mit der DNA-Sequenz nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 zumindest unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein eignet sich bevorzugt zur Behandlung von Erkrankungen mit Störungen in der differenzierungsinduzierenden Aktivität erythropoetischer Zellen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der vorliegenden Abbildungen unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsbeispiele näher beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen beschränkt.

Die Abbildungen zeigen:

- Abb. 1: Erythroide Differenzierungsinduktion in murinen F4N Erythroleukämiezellen durch 4 verschiedene WEHI-3-konditionierte Medien

- Abb. 2: Erythroide Differenzierungsinduktion in murinen B 8/3 Erythroleukämiezellen durch Kulturüberstände von der menschlichen Stromazelllinie L88/5, gemessen an den Tagen 3 und 4

- Abb. 3: Erythroide Differenzierungsinduktion in humanen K562 CML-Zellen durch 4 verschiedene WEHI-3-konditionierte Medien. Insbesondere mit dem WCM (C) ist ein Effekt erkennbar

- Abb. 4: Wirkung von WEHI-3-konditioniertem Medium auf Zellzahl und α -Globinsynthese von B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen

- Abb. 5: Wirkung von WEHI-3-konditioniertem Medium auf die Adhärenz von WEHI-3 Zellen am Plastikboden von Kulturgefäßen bei einer Kulturdauer von 72 Stunden

- Abb. 6: Gel-chromatographische Fraktionierung von WEHI-3-konditioniertem Medium mit Sephacryl S 300^R und biologische Testung auf EDA-Aktivität mit B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen in einer Kulturdauer von 4 Tagen. Gemessen wurde durch Northern Blot Analyse die Induk-

tion von α -Globin mRNA

- Abb. 7: Abhängigkeit der EDA-Produktion von der WEHI-3 Zelldichte bei der Ernte aus der primären, FCS-haltigen Kultur. Die Aktivität wurde durch 3-tägige Kultivierung von B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen mit den WEHI-3 Überständen und Auszählen des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen bestimmt
- Abb. 8: Fraktionierung des Überstandes von Versuch W3/2 (siehe Abb. 7) und Testung der Fraktionen durch 3-tägige Kultivierung mit B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen und Auszählung des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen
- Abb. 9: Schritte der Expressionsklonierung einer murinen eda-Sequenz durch graduelle Verminderung der in den biologischen Test einbezogenen Zahl von Klonen aus der Expressionsbibliothek
- Abb. 10: Expression der unvollständigen eda-Klone HA-15/2 und HA-12/1 in Cos-Zellen und Testen der Cos-Überstände in B8/3 Maus Erythroleukämiezellen in Kulturansätzen über 3 und 4 Tage. Ausgewertet wurde der Prozentsatz Benzidin-positiver Zellen. Am Tag 4 ist der Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Ergebnis mit dem Klon HA-15/2 knapp unter der 5% Signifikanzgrenze
- Abb. 11: Southern Blot Analyse von verschiedenen, EcoRI-geschnittenen Maus DNA's mit der murinen eda-Probe von HA-15/2. Analysiert wurde auch die DNA aus der humanen K562 Zelllinie (4. Bahn von links), die eine schwache Positivität durch Banden bei ca. 7,5 und 6,5 kbp bei hochstringenter Waschung erkennen läßt

- Abb. 12: eda Expression in der RNA der murinen Zelllinien NIH-3T3 und M2-10B4. Die Hybridisierung im Northern Blot wurde mit verschiedene Proben, wie im Text beschrieben, durchgeführt
- Abb. 13: Northern Blot Analyse der RNA verschiedener humaner Zelllinien mit der murinen eda-Probe aus HA-15/2. Bei den Zelllinien H33, Reh und K562 wurden je 15 µg Gesamt-RNA verwendet, bei der Jurkat-Probe ca. 5 µg poly(A)+RNA
- Abb. 14: eda-Expression in murinen Milzzellen (Stamm C3H) nach Stimulation mit Anti-T-Zellrezeptor-Antikörper oder Concanavalin A. Die densitometrischen Ergebnisse der Auswertung von Northern Blots nach Hybridisierung mit der murinen eda-Probe aus HA-15/2 sind getrennt dargestellt für die großen eda-Banden von von 2.200 und 7.000 bp, sowie für die kleineren, Abbauprodukte bedeutenden Banden von 600 und 400 bp
- Abb. 15: eda-Expression in murinen Mizzellen der Mausstämme CBA und CBL bei Durchführung einer 3-tägigen gemischten Milzzellkultivierung. Als Kontrollen sind die eda-Expression in muriner Plazenta und muriner foetaler Leber (d 15) dargestellt. Northern Blot Analyse mit 5 - 15 µg Gesamt-RNA und Verwendung des eda-Klons HA-15/2 als Sonde. Die Beladung der einzelnen Bahnen ist aus der anschließenden Hybridisierung der RNA-Proben desselben Filters mit einer Sonde für 28 S-RNA ablesbar
- Abb. 16: Expression der 2,2 kbp eda-mRNA Spezies bei semi-allogener (CBL-Zellen in (CBA x CBL) F₁-Hybride), bzw. isologer Transplantation von CBA x CBL-Milz-

zellen in dieselben Empfängertypen. Transplantiert wurden pro Tier 5×10^7 Milzzellen. Die eda-Expression von CBL-Zellen am Tag 0 wurde 100% gesetzt. Northern Blot Analyse von je 15 µg Gesamt RNA pro Bahn mit der murinen eda-Probe von HA-15/2

- Abb. 17: Konsensus-Teilsequenz der 2.200 bp eda cDNA. Diese Sequenz hat keinen durchgehenden offenen Leserahmen, so daß das Fehlen einzelner Abschnitte innerhalb der Sequenz möglich ist.
- Abb.18: Struktur der 2,2kb eda-cDNA. Abkürzungen: R 1-1 bis R 1-3 = 81 bp Repeats 1-3; R 2-1 und R 2-2 = ca. 180 bp Repeats 1 und 2; Tail = 3'-Ende des Gens, für alle mRNA-Spezies identisch; Unbekannt = ca. 500 bp bisher nicht bekannter Sequenz; Start? = 81 bp großer Abschnitt aus dem 5'-Bereich, dessen exakte Lokalisation innerhalb der Anfangssequenz der 2,2 kb eda-cDNA noch bestimmt werden muß.
- Abb. 19: Sequenz des 715 bp Klons DY-8. Die ersten 73 bp (kursiv) bestimmen das für diese RNA-Spezies eigene 5'-Ende (dieses ist möglicherweise noch nicht vollständig). Die kodierende Sequenz ist fett dargestellt.

Die beiliegenden Tabellen zeigen:

- Tabelle 1: Die prozentualen Verminderungen der EDA-Aktivität
- Tabelle 2: Zytokine ohne differenzierungsinduzierende Aktivität auf Maus-Erythroleukämiezellen

Tabelle 3: Repeatstrukturen in der presumptiven Konsensus-Teilsequenz der 2.200 bp eda-DNA.

Material und Methoden

Zelllinien:

Mit den folgenden Zelllinien wurden Untersuchungen angestellt: Die murine myelo-monozytäre Leukämiezelllinie WEHI-3 (Warner et al., 1980, ATCC Nr. TIB 68), die murine embryonale Fibroblastenlinie NIH-3T3 (ATCC Nr. CRL 1658), die humane, aus einer chronischen myeloischen Leukämie entstandene Linie K562 (ATCC Nr. CRL 243), die humane ALL Zelllinie Reh (Rosenfeld et al., 1975, ATCC Nr. CRL 8286), die von der Jurkat Zelllinie abstammende Linie H33HJ-JA1 (ATCC Nr. CRL 8163), sowie die Affennierenzelllinien Cos-1 (ATCC CRL 1650) und Cos-7 (ATCC CRL 1651) wurden von ATCC bezogen. Die murinen Zelllinien NFS-60 und NFS-61 (Holmes et al., 1985), DA-3 (Ihle et al., 1984) und FDCP-1 (Dexter et al., 1980) stammen von J. Ihle, Dept. of Biochemistry, St. Jude's Hospital, Memphis, Ten., U.S.A. Die murine myeloische Linie 32DC123 (Greenberger et al., 1983) ebenso wie die murine T-Helferzelllinie TS1-C3 (Uyttenhove et al., 1988) und die murine Thymom-Linie EL-4 (Farrar et al., 1983) stellte L. Hültner aus dem GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie zur Verfügung. Von ihm stammte auch die Mastzelllinie L138.8A (Hültner et al., 1989). Die murinen Friend Erythroleukämiezelllinien F4N und B8/3 (Ostertag et al., 1974) wurden von W. Ostertag, Abteilung für Virologie, Heinrich Pette-Institut, Hamburg, überlassen. Die humane T-Lymphomzelllinie Jurkat wurde uns von S. Thierfelder, GSF-Inst. f. Immunologie, München über-

lassen, und die murine Knochenmarkstromazelllinie M2-10B4 (Le-moine et al., 1988) stammt von C. Eaves, Terry Fox Institute, Vancouver, Kanada. Die humane Knochenmarkstromazelllinie L88/5 war bei uns im Institut aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders durch Transfektion mit einem Replikations-defizienten SV-40 Viruskonstrukt etabliert worden (Thalmeier et al, 1994).

Mäuse:

Alle Mäuse wurden aus der GSF-eigenen pathogenfreien Zucht bezogen. Folgende Stämme wurden verwendet: C3H, Balb/c, CBl (C57Bl6), CBA und AKR.

Medien für die Zellkultur:

Die Medien stammten von Life Technologies, D-76339 Eggenstein. Alle Zellen mit Ausnahme der Cos-1 und Cos-7 Zellen wurden in RPMI-1640 mit 2 mM l-Glutamin sowie je 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Dieses Medium enthielt weiter 10% foetales Kälberserum, das wir von verschiedenen Herstellern bezogen und auf die besonders gewünschten Eigenschaften (z.B. Unterstützung der Differenzierungs-Induktion oder optimale Proliferation) hin speziell aus-testeten. Zur Gewinnung von WEHI-3 konditioniertem Medium wurde ein serumarmes Medium aus RPMI-1640 Medium analog zu den Angaben von Guilbert und Iscove (1976) hergestellt. Dieses enthielt 0,1% bovines Serumalbumin, 2 mM l-Glutamin, 20 E Penicillin/ml, 20 µg/ml Streptomycin, 32 mg/ml Eisen-gesättigtes humanes Transferrin, 10^{-5} M l- α -Dipalmitoyllecithin, 2×10^{-5} M Ölsäure und 2×10^{-5} M Cholesterin. Für die Kultivierung von Cos-Zellen wurde Dulbecco's Medium mit 4,5 g/l D-Glucose, 10% FCS, 2 mM l-Glutamin und 100 E/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

Bakterienstämme:

Die Stämme DH5 (Life Technologies, D-76339 Eggenstein) und Su-

re^R (Stratagene, D-69044 Heidelberg) wurden verwendet.

Bakterienmedien:

Die Bakterien wurden routinemäßig in LB-Medium (Sambrook et al., 1989) kultiviert. Zur Transformation (Hanahan, 1983) wurde auch SOC-Medium nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) verwendet.

Vektoren:

Als prokaryontisch-eukaryontischer Shuttlevektor und Expressionsplasmid wurde ein 3.753 bp großer Vektor-Primer nach dem Prinzip von Okayama und Berg (1982) der Fa. USB, Cleveland, Ohio, U.S.A. verwendet. Dieses Plasmid pXRSP+ (Pruitt, 1988) enthält einen SV40 Origo. Die Genexpression wird in eukaryontischen Zellen vom frühen SV40 Promotor gesteuert. Außerdem enthält es eine SV40 Polyadenylierungsstelle.

Darüber hinaus wurde eine Genbibliothek in Lambda-Phagen angelegt unter Verwendung des Vektors Lambda-Zap II^R (Fa. Stratagene, La Jolla, CA., U.S.A.). Dieser Lambda-Phage erlaubt bei Verwendung eines geeigneten Bakterienstammes, z.B. Sure^R, die Blau-Weiß-Selektion und enthält ein Plasmid (pBluescript^R SK-), das durch den Helferphagen R408 zusammen mit dem Insert aus dem λ -Phagen herausgeschnitten werden kann.

Methoden:

Zur Zell- oder Organentnahme von Mäusen wurden die Tiere in Äthernarkose getötet. Für die RNA-Gewinnung kamen die Organe sofort in flüssigen Stickstoff und wurden aus diesem durch Zerkleinerung in gefrorenem Zustand in einem vorgekühlten Mörser unter Zugabe von Guanidinderhodanidpuffer weiter aufgearbeitet. Knochenmarkzellen wurden mit einer 12-Nadel mittels RPMI-Medium ohne Serum aus den Diaphysen von Femur und Tibia gespritzt und durch ein Sieb gegeben. Milzzellen wurden durch grobe Zerklei-

nerung der Organe mit einer Schere und durch Reiben durch ein Sieb mit Hilfe eines Spritzenstempels unter Zugabe von RPMI-Medium ohne Serumzusatz gewonnen.

Die Gesamt-RNA von Zellen wurde durch saure Phenolisierung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) gewonnen. Daraus wurde bei Bedarf die mRNA durch Hybridisierung an Oligo(dT), das über Streptavidin-Biotin an Magnetpartikel gebunden wurde (PolyAtract^R, Fa. Promega-Serva, D-69042 Heidelberg), isoliert. Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Proteinase K-Behandlung und Phenolisierung.

Hochkompetente Bakterien ($\sim 1 \times 10^9$ Kolonien/ μ g DNA) wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durch Kultivierung der Bakterien bei 18°C bis zu einer OD von 0,6 erhalten. Die Bakterien wurden in einen $MnCl_2$ - und $CaCl_2$ -haltigen Puffer überführt und mit 7% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Die cDNA-Synthese mit Hilfe des Vektor-Primers pXPRS+ wurde mit dem Kit Clonstruct^R der Fa. USB, Cleveland, Ohio, U.S.A., nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde der poly(A)-Teil der mRNA von WEHI-3 Zellen an einen poly(T)-Teil des offenen Vektor-Primers gebunden, und an diesem wurde anschließend die Erst- und Zweitstrangsynthese durchgeführt. Mittels terminaler Transferase wurde ein poly(C)-Teil an das 5'-Ende des Gens synthetisiert und ein komplementärer poly(G)-Strang durch Restriktion des 3'-Endes mit BstXI zur Ligation geschaffen. Hochkompetente DH5 Bakterien wurden nach den Angaben von Inoue et al. (1990) mit diesen ligierten Vektoren transformiert, wobei insgesamt etwa 5×10^5 Transformanten erhalten wurden. Diese wurden 1x in 500ml LB-Medium amplifiziert zur anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Ein Aliquot der so erhaltenen DNA-Bibliothek wurde auf einem 1%igen Agarosegel ungeschnitten nach

Größen getrennt. Unter Zuhilfenahme einer supercoilten DNA-Referenz (Life Technologies, D-76339 Eggenstein) wurden Plasmide mit Insertgrößen von 600 bis 2.500 bp aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die so gewonnene DNA wurde zur erneuten Transfektion hochkompetenter DH5 Bakterien im Rahmen der Expressionsklonierung verwendet.

Zur Herstellung der Phagenbibliothek aus NIH-3T3 mRNA wurde der Time Saver[®] cDNA-Synthesekit der Fa. Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg nach Vorschrift des Herstellers verwendet. An beide Enden der cDNA wurden NotI-EcoRI-Adaptoren ligiert. Die EcoRI-Schnittstellen wurden mit denen des EcoRI-geschnittenen Lambda ZapII[®]-Phagen der Fa. Stratagene, La Jolla, CA., U.S.A., ligiert. Anschließend wurden die Phagen mit dem Verpackungskit Gigapack II[®] der Fa. Stratagene verpackt und nach Vorschrift dieses Herstellers zur Infektion von Sure[®]-Bakterien verwendet. Nach Selektion positiver Klone mit einer radioaktiven Sonde wurden die Inserts zusammen mit dem Plasmid pBlueskript[®] SK durch den Helferphagen R408 aus den Lambda-Phagen herausgeschnitten.

Die Gelelektrophorese von DNA erfolgte standardmäßig mit 0,8 bis 1,5% Agarosegelen. DNA-Fragmente wurden in Low Melting Point Agarose SeaPlaque[®] GTC[®] (FMC Bio Products, Rockland, ME., U.S.A.) getrennt und dann herausgeschnitten. Mit GELase[®] (Biozym Diagnostik GmbH, D-31833 Hess. Oldendorf) wurde anschließend die Agarose nach Vorschrift des Herstellers verflüssigt. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe von Microcon 100[®] Konzentratoren (Amicon GmbH, D-58453 Witten). Für die analytische Fraktionierung von RNA wurden 2,2 M Formalin-1,2% Agarose-Gele verwendet. DNA- und RNA-Gele wurden zur Hybridisierung auf Hybond-N[®] Nylonfiltermembranen (Amersham-Buchler, D-38110 Braunschweig) mit Hilfe einer VacuBlot[®]-Apparatur (Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg) geblottet. Der radioaktive Nachweis bestimmter DNA-

oder RNA- Banden auf den Nylonmembranen erfolgte durch Markierung der entsprechenden Sonden mit ^{32}P -dCTP mit Hilfe des Random Primed DNA Labeling Kits der Fa. Boehringer Mannheim. Nach Waschung der hybridisierten Filtermembranen entsprechend der gebotenen Stringenz nach den Vorschriften von Sambrook et al., 1989, wurden Röntgenfilme mit diesen Filtern exponiert. Zur Quantifizierung wurden Fuji Imaging Plates (Fa. Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan) mit den Filtern exponiert und in einem Fuji Phospo-Imager digitalisiert und per Computer ausgewertet. Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten erfolgte über das Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) unter Verwendung von Di-Desoxynucleotiden.

Die Transfektion von Cos-1 und Cos-7 Zellen erfolgte mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode (Cullen, 1987). Nach 30 min Inkubation der Zellen mit 500 ng DNA/3,5 cm² Kulturschale und 5% DEAE-Dextran, und nach 2,5-std. Inkubation mit 80 µM Chloroquin wurde anstelle des in der Vorschrift angegebenen DMSO-Schocks eine 3-minütige Inkubation mit 15% gepuffertem Glycerin durchgeführt. Dadurch wurde ein deutlich niedrigerer Background der Differenzierungsinduktion durch die Cos-Zellüberstände erreicht. Die konditionierten Cos-Überstände wurden nach 72 Stunden geerntet und in geometrischen Verdünnungsreihen mit initial 50% Überstand den murinen Erythroleukämiezellen in 96-Mikrowellplatten zugesetzt. Die Differenzierungsinduktion in diesen Ansätzen wurde durch Auszählen des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen nach 3 und/oder 4 Tagen bestimmt. Dazu wurde eine Stammlösung von 10 mg N,N,N',N'-Tetramethylbenzidin (Sigma Biochemicals, D-82039 Deisenhofen) in 10 ml 12% Essigsäure angesetzt (NTMB-Lösung). Unmittelbar vor der Färbung wurde eine Verdünnung von 35 µl NTMB-Lösung mit 35 µl Isopropanol und 5 µl 30% H₂O₂ angesetzt. Je nach Zelldichte wurden 5 -10 µl der Zellen in ein neues Mikrowell pipettiert und mit frischem RPMI 1640 Medium mit 10% FCS auf 100 µl aufgefüllt. Dazu wurden 5 µl

der verdünnten NTMB-Lösung gegeben. Zwischen 10 und 30 Minuten danach wurden die Benzidin-positiven Zellen prozentual auf Grund ihrer Grünfärbung unter einem Umkehrmikroskop in den Mikrowells ausgezählt.

Zur Herstellung von WEHI-3 konditionierten Medien wurden die Zellen 3 Tage zuvor in einer Dichte von $2,5 \times 10^4/\text{ml}$ in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und den üblichen anderen Zusätzen ausgesät. Nach 3 Tagen waren die Zellen auf Dichten zwischen $3,5 \times 10^5$ und $1,2 \times 10^6/\text{ml}$ herangewachsen. Sie wurden abzentrifugiert und 1x in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze gewaschen und dann in serumarmem Medium auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Nach 3 Tagen wurde das konditionierte Medium geerntet und nach scharfer Abzentrifugation mit einem Amicon 10 Konzentrator 10-fach eingeeengt. Diese WEHI-3-konditionierten Medien (WCM's) wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren. In dieser Form waren die Überstände über 3 Jahre mit einem allmählichen 2- bis 8-fachen Aktivitätsverlust haltbar.

Zur Fraktionierung wurde 20- bis 50-fach konzentriertes WCM durch Gelfiltration mit Sephacryl 300[®] in einem Gelbett von $90 \times 2,6$ cm mit PBS als Laufpuffer und einer Laufgeschwindigkeit von 10 ml/min in einzelne Fraktionen aufgetrennt und bei 280 nm detektiert. Als Molekularstandards dienten BSA (68 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Zytochrom C (12,5 kDa).

Die relative Zellzahl pro Mikrowell in 96-well-Platten wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt (Mosmann, 1983). Hierbei wird die Fähigkeit der Zellen gemessen, das gelbe Tetrazoliumsalz von 3-(4,5 Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in das violette MTT-Formazan umzuwandeln. Diese Fähigkeit ist an die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien gebunden, womit letztlich die Zellzahl relativ über die Anzahl aktiver Mitochondrien bestimmt wird. Die Farbtintensität wurde mit einem

Elisa-Reader (SLT, Salzburg) bei einer Testwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt.

Die Adhärenz von WEHI-3-Zellen wurde nach Inkubation mit WCM durch ihr Anhaften an den Plastikboden von 96-well-Platten (Nunc GmbH, 65203 Wiesbaden) getestet. Dazu wurde der Überstand aus den einzelnen Mikrowells entnommen und der Boden der Mikrowells 1 x mit frischem Medium (RPMI 1640 ohne Zusätze) gespült. Nach Absaugen des Mediums mit den losgelösten Zellen im Überstand wurde frisches RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 2 mM l-Glutamin hinzugefügt und der MTT-Test durchgeführt. Die losgelösten und zuvor bereits im Überstand schwimmenden Zellen wurden in neue Mikrowells pipettiert und in gleicher Weise durch den MTT-Test gemessen.

Ergebnisse

EDA-Aktivitäten in verschiedenen Zelllinien

Abb. 1 zeigt den Einfluß von 4 verschiedenen WEHI-3 konditionierten Medien auf die Zahl Benzidin-positiver F4N-Zellen, und damit auf die Differenzierung und Hämoglobinisierung dieser Zellen. Als positive Kontrolle ist die Zahl Benzidin-positiver Zellen bei Inkubation mit 1,2% DMSO dargestellt. Mit DMSO werden bis zu 70% der F4N-Zellen am 4. Tag positiv. Bei vergleichbarer Stärke der Differenzierungsinduktion mit WCM in diesem Versuch ist die Kinetik jedoch eine andere als mit DMSO: Erst am Tag 3 wird durch WCM in diesen Zellen eine Differenzierung induziert, die sich deutlich von den negativen Kontrollen unterscheidet. Diese Aktivität im WCM, gemessen an murinen Friend Erythroleukämiezellen, erhielt die Arbeitsbezeichnung "EDA" für Erythroid Differentiation Activity. Die Stärke der Differenzierungsinduktion mit demselben WCM unterlag in den einzelnen Versuchen stärkeren, auf die Differenzierungsbereitschaft der Erythroleukämiezellen zurückzuführenden Schwankungen. Faktoren des

Mediums, des FCS und die Ausgangszelldichte der Erythroleukämiezellen waren von Bedeutung. Routinemäßig wurde deshalb in solchen Untersuchungen ein Referenz-WCM als positive Kontrolle mituntersucht. EDA wurde nicht nur in Überständen von WEHI-3 Zellen gefunden, sondern, in schwächerer Konzentration, auch in solchen von NIH-3T3 Zellen, und auch in Überständen der humanen Knochenmarkstromazelllinie L88/5, allerdings erst nach Bestrahlung und einer längeren Kultivierungsdauer (Abb. 2).

EDA-Wirkung auf murine und humane Zellen

Der auf die Mauszellen wirkende Faktor kann demnach sowohl murinen als auch humanen Ursprungs sein. Auch der murine Faktor im WCM hat eine schwache Wirkung auf die humanen K562 Zellen, die sich durch DMSO nicht zur erythropoetischen Differenzierung induzieren lassen (Abb. 3, insbesondere WCM (C)). Die mit EDA bezeichnete Aktivität ist demnach in beiden Richtungen Speziesübergreifend.

Biologische Eigenschaften der untersuchten Aktivität

Die Wirkung von EDA auf Erythroleukämiezellen der Maus ist nicht primär eine Proliferationshemmung. Obwohl in vielen Versuchen eine Proliferationshemmung bei höheren Konzentrationen des Faktors von erheblicher Bedeutung war, zeigen Versuche wie z. B. in Abb. 4 dargestellt bei deutlicher Differenzierungsinduktion, erkennbar an der Zunahme der α -Globin mRNA Expression, keinen Einfluß auf die Proliferation. Diese Differenzierungsinduktion war mit einer Downmodulation der c-myc Transkriptmenge verbunden, die sich auch bei Inkubation anderer Zellarten wie 32DC123 mit WCM deutlich nachweisen ließ, und die darüberhinaus mit einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der c-myc mRNA Halbwertszeit verbunden war. Da eine Downmodulation von c-myc in vielen hämopoetischen Zellsystemen im Rahmen einer

Differenzierung zu finden ist, wird angenommen, daß die erythropoetische Differenzierungsinduktion von EDA nur die Wirkung auf eines von mehreren Zellsystemen darstellt. In diesem Sinne ist möglicherweise die von uns nachgewiesene Zunahme der Adhärenz von WEHI-3-Zellen durch ihr eigenes konditioniertes Medium (Abb. 5) als auto-induktive Wirkung im Sinne einer Differenzierungsinduktion zu werten. Die Zunahme der Adhärenz dieser myelomonozytären Zellen bedeutet in diesem Zusammenhang einen Differenzierungsschritt in die Richtung von Makrophagen. Nach diesen Befunden und bei der Annahme, daß die Effekte ebenfalls durch EDA bedingt wurden, besteht die Möglichkeit, daß es sich bei EDA um einen Faktor handelt, der zumindest in hämopoetischen Zellen ganz allgemein Differenzierung induziert.

Physikalische und chemische Eigenschaften von EDA

Einige physikalischen und chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Ausschluß einzelner Zytokine als Verursacher der EDA-Wirkung

Theoretisch kommt eine Reihe von Zytokinen als Verursacher der Wirkungen in Betracht, die im Differenzierungsassay mit den murinen Erythroleukämiezellen beobachtet werden. Verschiedene Zytokine konnten als Verursacher ausgeschlossen werden. (Tab. 2).

Fraktionierung von WEHI-3 konditionierten Medien

WEHI-3 konditionierte Medien wurden mittels Sephacryl S300^R Gelfiltration fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden nach Zusatz von 0,05% BSA als 20%iger Volumenanteil mit B8/3-Zellen in 5 ml-Kulturen 4 Tage inkubiert. Anschließend wurde die relative Menge an gebildeter α -Globin mRNA quantifiziert. Der Hauptgipfel in Abb. 6 lief mit der kleinmolekularen Flanke

des BSA.

Suche nach optimalen Bedingungen der EDA Expression für Expressionsklonierung

WEHI-3-Zellen wurden in 250 ml Flaschen in FCS-haltigem Medium bis zu verschiedenen Dichten gezogen. Der größere Teil wurde nach Erreichen der unterschiedlichen Dichten (Abb. 7) für die Präparation von mRNA geerntet, und ein kleinerer Teil wurde unter Standardbedingungen 3 Tage zur Gewinnung von WCM in serumarmem Medium weiterkultiviert. Abb. 7 zeigt, daß die angestrebten Dichten von ca. $2,5 \times 10^5$ (W3/1), 5×10^5 (W3/2) und 8×10^5 Zellen/ml (W3/3) nach unterschiedlichen Zeiten erreicht waren. Die Zellen wurden bei einer einheitlichen Dichte von 1×10^6 /ml weiterinkubiert. Die höchste EDA-Aktivität fand sich in den W3/2-Überständen (Abb. 7). Die RNA der geernteten W3/2-Zellen wurde deshalb für die Konstruktion einer Expressionsbibliothek weiterverarbeitet. Aus Abb. 7 wird auch deutlich, daß bei höheren Konzentrationen der WCM's immer auch eine Inhibition der Differenzierungsinduktion zu finden ist. Gleichzeitig findet man für diese Konzentrationen eine Inhibition der Proliferation. In Abb. 8 ist für das WCM von W3/2 gezeigt, daß die optimale Konzentration für eine Differenzierungsinduktion in B3/3-Zellen durch WCM-Fraktionen zwischen 66 und 25 kDa bei 25% liegt. Obwohl in dieser Analyse in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Abb. 6 der Hauptpeak von EDA bei einer Molekülgröße zwischen 60 und 40 kDa gefunden wurde, zeigten andere, ähnliche Untersuchungen deutliche Aktivitäten bis herunter zu Molekülgrößen von 10 kDa. Das Vorliegen unterschiedlich großer Moleküle mit EDA-Wirkung, oder die Zusammenlagerung von EDA in unterschiedlich großen Aggregaten, ist eine mögliche Erklärung.

Beim Austesten der optimalen Kulturbedingungen von WEHI-3 Zel-

len für die Gewinnung hoher Aktivitäten von EDA fiel auf, daß die Art der primären Inkubation in 10% FCS von Bedeutung ist. Beim Austesten von 6 verschiedenen Batches von FCS verschiedener Hersteller war die Ausbeute an EDA-Aktivität sehr unterschiedlich. Mit dem günstigsten FCS wurden die weiteren Versuche angestellt. Weiterhin war ein wichtiger Befund, daß die Gewinnung von EDA-Aktivität nicht möglich war, wenn im zweiten Kultivierungsteil (normalerweise 72 h in serumarmem Medium mit 1% BSA) dasselbe Medium wie im ersten Teil mit 10% FCS verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

Konstruktion einer Expressionsbibliothek mit W3/2 RNA und dem Vektor pXPRS+

Die nicht-amplifizierte Bibliothek umfaßte ca. 5×10^5 Klone. Nach Amplifikation und Größenselektion (Inserts >600 bp) wurden je ca. 500 Klone auf einen runden Hybond-N^R-Filter von 14 cm Durchmesser auf LB-Agar plattiert. Die Klone wurden durch Filterabklatsch auf einem 2. Filter zur Isolierung der Plasmid DNA gezogen. Nach Transfektion dieser DNA in Cos-1 Zellen wurde der Cos-1 Überstand im Ansatz mit B 8/3 Zellen getestet. Insgesamt wurden auf diese Weise 25.000 Klone gescreent. In der Serie D ergab sich ein positives Signal (Abb. 9). Die 520 Klone der Serie D wurden in Gruppen von je ca. 25 unterteilt und erneut getestet (Serie D15). Darauf erfolgte ein Schritt mit je ca. 10 Klonen (Serie DX), und schließlich wurde jeder Klon der letzten 10 einzeln getestet (Serie DY). Der Klon DY-8 hatte eine um 1-2 Verdünnungsstufen geringere Aktivität als die positive Kontrolle.

Radioaktives Screenen der pXPRS+ Bibliothek mit dem Klon DY-8

Der Klon DY-8 zeigte einen Größenbereich von ca. 950-750 bp, wobei statt einer scharfen Bande ein Schmier über ca. 200 bp

vorhanden war. Wegen des Verdachts eines unvollständigen Klons wurde die Genbibliothek mit DY-8 als Sonde radioaktiv gescreent. Insgesamt wurden 32 positive Klone erhalten, wobei der größte ca. 1.350 bp betrug. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung HA-15/2. Er zeigte eine schwache Differenzierungs-induzierende Wirkung, für die in 3 Versuchen allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde (Abb. 10). Wegen seiner Größe diente er bei den weiteren Detektionensarbeiten durch Hybridisierung (Southern Blot, Northern Blot, weiteres Screenen einer anderen Genbibliothek) als radioaktive Sonde, auch wenn anzunehmen war, daß es sich um einen unvollständigen Klon handelte.

Anlegen einer Genbibliothek in Lambda-Phagen

Unter der Annahme, daß die stärkste Aktivität von eda von einer 2,2 kbp großen mRNA-Spezies herrühre, die besonders stark in NIH-3T3 Zellen exprimiert wird (s. u.), wurde cDNA aus NIH-3T3 poly(A)+ mRNA umgeschrieben und auf einem nicht-denaturierenden Gel nach Größen getrennt. Der Bereich von 1.900 bis 2.500 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in Lambda Zap II^R-Phagen einkloniert. Alle eda Klone, die mit diesem Verfahren erhalten wurden, waren jedoch kleiner als 1.500 bp.

outhern Blot Analysen

Analysen von genomischer DNA aus der Milz von C3H-Mäusen zeigten bei Hybridisierung mit der 1.350 bp großen Sonde HA-15/2 (BamHI-Fragment), insbesondere nach Verdau der DNA mit SacI, 4 Banden von 6,5, 5,7, 3,8 und 2,1 kbp. Mit EcoRI ergaben sich in der DNA von WEHI-3 Zellen 2 schwache Banden bei 7,5 und 5,5 kbp. Wichtig war die Beobachtung, daß auch menschliche genomische DNA, gewonnen aus der Zelllinie K562, nach EcoRI-Verdau eine Bande bei 7,5 kbp sowie eine weitere bei 6,5 kbp aufwies (Abb. 11). Da die Waschbedingungen hochstringent gewesen waren

(bis 2×30 min $0,1 \times \text{SSC}$ / $0,1\%$ SDS bei 60°C), dürften das murine und das menschliche Gen einige Homologie aufweisen. Die Möglichkeit, das menschliche eda-Gen mit einer murinen radioaktiven Sonde aus einer Genbibliothek zu gewinnen, ist durch Abb. 11 belegt.

Untersuchungen der eda-Genexpression

Die Untersuchungen wurden mit dem ca. 1.350 bp großen BamHI-Fragment von HA-15/2 als Sonde durchgeführt. Im Northern Blot finden sich bei stringenter Waschung (bis 20 min $0,1 \times \text{SSC}$ / $0,1\%$ SDS und 60°C) eine Reihe unterschiedlich großer und unterschiedlich stark hybridisierender Banden (Abb. 12). Einzelne Banden, die größer als 5 kbp sind, sind von Zellart zu Zellart unterschiedlich (s. u.). Die im allgemeinen stärkste Bande liegt bei 2.200 bp, weitere Banden finden sich in unterschiedlich starker Ausprägung bei 1.750 bp, 1.350 bp und 1.200 bp. Abb. 12 zeigt, daß alle Banden mit der gesamten Probe (BamHI-Fragment von HA-15/2) genauso gut hybridisieren wie mit den 500 3'-Basenpaare dieser Probe, daß dagegen die 200 Basenpaare am 5'-Ende dieser Probe nur mit den großen Banden über 5.000 bp und mit der 2.200 bp Bande hybridisieren. Daraus ist zu schließen, daß die großen Banden zumindest Anteile von allen kleineren Banden enthalten, daß die 2.200 bp Bande aber als einzige der kleineren Banden den 5'-Teil der Probe enthält, während der 3'-Teil der Probe in allen Banden gemeinsam vorkommt. Bei einer Untersuchung von verschiedenen Mausstämmen wegen der Unterschiedlichkeit der Banden in den 2 Zellarten NIH-3T3 und M2-10B4 (Abb. 12) ergab sich, daß innerhalb eines Stammes in den verschiedenen Geweben alle Banden identisch sind, daß die Banden aber von Mausstamm zu Mausstamm variieren. NIH-3T3 Zellen sind Fibroblasten, die sich von Swiss-Mäusen ableiten, während die Knochenmarkfibroblasten der Linie M2-10B4 von B6C3F₁ Mäusen

abstammen (Lemoine et al., 1988). Analog findet man auf genomischer DNA-Ebene zahlreiche Restriktionsunterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen (Daten nicht gezeigt).

Expressionsmuster von eda in Geweben der normalen Maus

An C3H-Mäusen wurde das Expressionsmuster der verschiedenen Gewebe geprüft. Die stärkste Expression fand sich im normalen Thymus (adult und foetal (d.15) etwa gleich) und in der foetalen Leber (d. 15). Es folgte in der Expressionsstärke die Milz, und deutlich schwächer war die Expression im normalen Knochenmark. Eine ganz schwache Expression, teilweise nur auf poly(A)+ Ebene detektierbar, fand sich in allen untersuchten Organen und Geweben wie Leber, Niere, Darm, Hirn und Plazenta. Primäre Mastzellen dagegen, die aus dem Knochenmark durch 4-wöchige Kultivierung des Knochenmarks mit IL-3 kultiviert wurden, waren stärker positiv als normale Milzzellen.

Expressionsmuster in murinen Zelllinien

Die Expressionsstärke in den Zelllinien war sehr unterschiedlich, im allgemeinen aber stärker als in den primären Geweben. Unter den nicht-malignen Zellen zeigte die embryonale Fibroblastenlinie NIH-3T3 eine starke Expression, während die Fibroblastenlinie L929 fast keine Expression aufwies. Eine Mittelstellung nahm die Knochenmarkfibroblastenlinie M2-10B4 ein. Eine sehr starke Expression fand sich in der T-Helferzelllinie TS1-C3, während die Thymom-Zelllinie EL-4 fast keine Expression aufwies. Die myeloischen Zelllinien FDCP-1 und 32DC123 sowie die Mastzelllinie 138-8A zeigten nur eine schwache Expression. Die aus murinen malignen hämopoetischen Geweben etablierten Zelllinien zeigten im allgemeinen eine starke bis sehr starke Expression. Dieses wurde bei den WEHI-3-Zellen, bei DA-3, NFS-60 und NFS-61 (alle Zelllinien stammen von murinen Leukämien ab) deut-

lich.

Expressionsmuster in humanen Zellen

Mit HA-15/2 als radioaktiver Sonde gelingt es, wenn auch mit erheblichem Background, eine Expression von eda in menschlichen Zellen nachzuweisen. Der Background bezieht sich auf eine starke Mithybridisierung von 28S ribosomaler RNA, so daß stringent bis 20 min $0,2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS bei 60°C gewaschen werden muß, um die entscheidenden Banden zu erkennen. Insbesondere in der poly(A)+ RNA von Jurkat-Zellen fanden wir ein Transcript bei 2,5 kbp, und auch in der Gesamt-RNA von K562 Zellen sieht man schwach eine solche Bande (Abb. 13). Von den niedermolekularen eda mRNA-Spezies wurde bislang nur in einem Fall einer T-CLL eine distinkte Bande bei 1.100 - 1.200 bp unter Verwendung der murinen Sonde gefunden (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen der eda mRNA Expression in murinen Milzzellen

Milzzellen verlieren bei in vitro-Inkubation (1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 mit 10% FCS und den üblichen Zusätzen) innerhalb weniger Stunden ihre eda Expression. Bei Zugabe von Anti-T-Zellrezeptor-Antikörper oder Concanavalin A (Abb. 14), oder auch von TPA, kommt es innerhalb von 1 Stunde zu einer leichten Verstärkung der 2,2 kbp Bande sowie der größeren Banden, nach 4 Stunden sind diese Transkripte aber bereits wieder vermindert, und es herrscht eine Akkumulation von eda Abbauprodukten ($<400\text{bp}$) ohne Stabilisierung der normalen Transkripte vor. Innerhalb von 24-28 Stunden klingen diese Effekte weitgehend ab.

Eine Stabilisierung der eda mRNA in Milzzellen in vitro wurde dagegen erreicht, wenn eine 3-tägige gemischte Milzzell-Reaktion mit je 1×10^6 unbestrahlten und unbehandelten CBA- und CBL-Zellen/ml durchgeführt wurde (Abb. 15). Waren die CBA-Milz-

zellen dagegen zuvor mit 15 Gy bestrahlt worden, trat wiederum keine Stabilisierung der mRNA ein, ebensowenig, wie wenn CBL Milzzellen alleine in vitro kultiviert wurden.

Die Beteiligung von *eda* an der allogenen Reaktion, interessanterweise nur bei Stimulation durch unbestrahlte Zellen (Abb. 15), wurde in einem in vivo Modell der akuten Graft versus Host (GvH)-Erkrankung bestätigt. Wenn (CBA x CBL) F₁-Hybriden nach 9 Gy Ganzkörper-Bestrahlung 5 x 10⁷ CBL Milzzellen injiziert werden, entwickelt sich eine schwere GvH-Erkrankung. Im Rahmen dieser Erkrankung fanden wir am 6. Tag nach der Transplantation in der Milz der Empfängertiere einen ca. 7-fachen Anstieg der *eda*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen die *eda*-Expression abfiel (Abb. 16). Diese Reaktion war auf die Milz beschränkt, wahrscheinlich, weil in den anderen untersuchten Organen der prozentuale Anteil der an der GvH-Erkrankung beteiligten Entzündungszellen, bezogen auf alle Zellen, zu gering war, um einer Erhöhung der *eda*-Expression im Northern Blot sichtbar zu machen.

Sequenzanalysen von *eda*

Die DNA-Sequenz von *eda*, bzw. von den verschiedenen cDNA Spezies, erwies sich als schwierig analysierbar, insbesondere wegen zahlreicher Repeat-Strukturen und AT-reicher Abschnitte. Aus verschiedenen Klonen der pXPRS⁺ und Lambda Zap II^R Bibliotheken wurde eine Konsensus-Sequenz abgeleitet (Abb. 17), die am ehesten ein Teil der 2,2 kbp cDNA sein dürfte. Abb. 18 zeigt die anzunehmende Struktur der 2,2 kbp Sequenz, die noch nicht vollkommen analysiert werden konnte. Die mit dicken Strichen gekennzeichneten Abschnitte sind von ihrer relativen Zuordnung her gesichert. Nicht gesichert ist jedoch, ob die noch fehlenden ca. 500 bp im Anfangsteil der Sequenz liegen, wie in Abb. 18 angedeutet. Ein offener Leserahmen wurde demzufolge noch

nicht gefunden. In Abb. 19 ist die Sequenz des DY-8 Klons wiedergegeben. Diese Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, jedoch ist die Aktivität dieses Klons bei Transfektion in Cos-Zellen nicht stark genug um anzunehmen, daß das echte 5'-Ende bereits detektiert ist.

Literatur

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987)

Cullen BR: Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes., pp 684-704. In: Methods in enzymology, vol. 152: Guide to molecular cloning techniques (eds. Berger SL, Kimmel AR), Academic Press, New York, 1987

Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnick E, Metcalf D: Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. J. Exp. Med. 152, 1036 (1980)

Farrar JJ, Howard M, Fuller-Farrar J, Paul WE: Biochemical and physiochemical characterization of mouse B cell growth factor: a lymphokine distinct from interleukin 2. J. Immunol. 131, 1838-1842 (1983)

Greenberger JS, Eckner RJ, Sakakeeny M, Marks p, Reid D, Nabel D, Hapel A, Ihle JN, Humphries C: Interleukin 3-dependent hemopoietic progenitor cell lines. Fed. Proc. 42, 2762 (1983)

Guilbert LJ, Iscove NN: Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. Nature 263, 594-595 (1976)

Hanahan D: Studies of transformation of Escherichia coli with plasmid. J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983)

Holmes KL, Palaszynski E, Frederickson TN, Morse III HC, Ihle JN: Correlation of cell-surface phenotype with the establishment of interleukin 3-dependent cell lines from wild-mouse murine leukemia virus-induced neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6687-6691 (1985)

Hültner L, Moeller J, Schmitt E, Jäger G, Reisbach G, Ring J, Dörmer P: Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J. Immunol.* 142, 3340-3446 (1989)

Ihle JN, Rein A, Mural R: Immunological and virological mechanisms in retrovirus induced murine leukemogenesis. In: *Advances in viral oncology*, vol. 4 (G Klein, ed.), 95-137, Raven Press, New York 1984

Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990)

Lemoine FM, Humphries RK, Abraham SDM, Krystal G, Eaves CJ: Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells. *Exp. Hematol.* 16, 718- (1988)

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63 (1983)

Okayama H, Berg P: High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170 (1982)

Ostertag W, Roesler G, Krieg CJ, Kind J, Cole T, Crozier T, Gaedicke G, Steinheider G, Kluge N, Dube S: Induction of endo-

genous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4980-4985 (1974)

Pruitt SC: Expression vectors permitting cDNA cloning and enrichment for specific sequences by hybridization/selection. Gene 66, 121-134 (1988)

Rosenfeld C, Venuat AM, Goutner A, Guégang J, Choquet C, Tron F, Pico JL: An exceptional cell line established from a patient with acute lymphoid leukemia. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 16, 1075 (1975)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. Second edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5471 (1977)

Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A, Dörmer P: Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood 83, 1799-1807 (1994)

Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J: Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6934-6938 (1988)

Warner NL, Moore MAS, Metcalf D: A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice: cytology, karyotype and muramidase content. J. Natl. Cancer Inst. 43, 963 (1980)

Tabelle 1: Prozentuale Verminderungen der EDA-Aktivität

1.	Trypsin Verdau: 50 µg/ml 30 min 37°C:	75,7%
2.	Spaltung von Disulfid-Bindungen: 50 mM DTT, 2 h bei Raumtemperatur:	98,5%
3.	Hitzeinaktivierung: 60°C, 20 min:	0 %
4.	Hitzeinaktivierung: 80°C, 20 min:	61,7%
5.	Gefrieren und Auftauen (5 Zyklen):	37,1%

Tabelle 2: Zytokine ohne Differenzierungs-induzierende Wirkung auf Maus Erythroleukämiezellen

Zytokin	getestete Zellen	Methode	Ergebnis
Epo	F4N	Benzidin	neg.
IL-3	F4N	Benzidin	neg.
IL-6	F4N, B8/3	α -Globin mRNA	neg.
LIF	F4N, B8/3	α -Globin mRNA	neg.
TNF- α	F4N, B8/3	α -Globin mRNA	neg.
TGF- β	F4N, B8/3	α -Globin mRNA	neg.
Kit Ligand	B8/3	Benzidin	neg.

Tabelle 3: Repeatstrukturen in der presumptiven Konsensus-Teilsequenz
der 2.200 bp *eda* cDNA

1. 42 bp Repeat

855 CGTCCGCCGG TCACGGCCGC CGCCCCCAGC GACGTCACCC AC

Wiederholung von 1248 - 1289

2. 55 bp Repeat

903 AGAAGCGGAC GCCGCGGTCA AGATGTCTCT GCCATGCCCA CGGGACGCAC
953 GGACG

Wiederholung von 1304 - 1358

3. 81 bp Repeat

163 TAGTCCTGCC GTCGTCAATG GTTCTCTATG GGCTTTCAGA GTGAGTGGCG
213 GGAAGGCGGC CCCGAGGCAT GCTGGGAGTT G

Wiederholungen von 82 -162; und von 244 - 324

4. 178 - 180 bp Repeat

348 GTTTCTCTGT ATAGACCTGG CTGTGGATTT TTCGCTAATT CTTTTTTTTTA
398 GCTTTATTTT TAATTTTTTAC TTTTTCACAC AGGATTTCTC TTTATAGCCT
448 TGGCTACCGT TTTTCCCTA ATTATTCTCC TTTTCATTTT GGTTTATTTT
498 TTTTAAATTT TGGTTTTTTT AAGACAGG

Wiederholung von 526 - 705

REINHARD · SKUHRA · WEISE & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

Deutsches Patentamt
Zweibrückenstraße 12

80297 München

DR. ERNST STURM
DR. HORST REINHARD
DIPLOM. UDO SKUHRA
DIPLOM. REINHARD WEISE
DR. WERNER BEHNISCH

FRIEDRICHSTRASSE 31
D-80801 MÜNCHEN

POSTFACH 440151
D-80750 MÜNCHEN

TELEFON: 089/38 16 100
TELEX 5212839 isar d
TELEFAX 089/3401479

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P7996
Dr.B/cl

28. März 1996

Anmelder:

GSF-Forschungszentrum für
Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1, Neuherberg
85764 Oberschleissheim

Neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen

Patentansprüche

1. Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität mit den nachfolgenden Eigenschaften:
 - a) isolierbar aus murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinien;
 - b) isolierbar aus bestrahlten humanen Knochenmarkstromazellen;
 - c) induziert Differenzierung in Friend-Erythroleukämiezelllinien unter Hämoglobinbildung;
 - d) mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 10 - 60 kDa;
 - e) induzierbar durch einen im fötalen Kälberserum vorkommenden Serumfaktor;
 - f) mit einer Expression der zugehörigen mRNA in primären Zellen aus Thymus, foetaler Leber, adulter Milz oder

Knochenmark;

- g) mit einer stabilen Expression der zugehörigen mRNA in vitro, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämmen CBA und C57Bl6 durchgeführt wird;
 - h) mit charakteristischen Repeat-Strukturen in der für das Protein kodierenden cDNA;
 - i) mit AT-reichen Abschnitten in der für das Protein kodierenden cDNA;
 - k) mit zugehörigen mRNA-Spezies unterschiedlicher Größe, die aus gleichen 3'-Bereichen, aber unterschiedlichen 5'-Bereichen bestehen.
2. Protein nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die murine myelomonozytäre leukämische Zelllinie WEHI-3, ATCC TIB68 ist und die Friend-Erythroleukämiezelllinie F4N oder B8/3 ist und die bestrahlte humane Knochenmarkstromazelllinie L 88/5 (DSM ACC 2056) ist.
3. Protein nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine oder mehrere der in Tabelle 3 gezeigten Repeatsequenzen oder mit diesen Repeatsequenzen unter stringen-ten Bedingungen hybridisierende Repeatsequenzen in der für das Protein nach Anspruch 1 oder 2 kodierenden DNA vorliegen.
4. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es aus Humanzellen, Mauszellen oder den Kulturüberständen von Human- oder Mauszelllinien isoliert ist.
5. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäureteilsequenz aufweist, die von einer
mit der cDNA der SEQ ID NO:1 oder NO:2 hybridisierenden
DNA kodiert wird.

6. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäureteilsequenz aufweist, die von einer
mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 unter stringenten
Bedingungen hybridisierenden DNA kodiert wird.
7. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Teile, Analoga und Derivate des Proteins sowie Fusionsproteine mit umfaßt sind.
8. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in im wesentlichen gereinigter, nativer Form.
9. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in im wesentlichen rekombinanter Form.
10. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen.
11. Protein nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß es einen erythropoeseinduzierenden Effekt auf die menschliche Leukämiezelllinie K 562 (ATCC Nr. CRL243) aufweist.
12. DNA-Fragment gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2, Teile, Derivate und Analoga hiervon.

13. DNA-Fragmente, Teile, Analoga und Derivate hiervon, die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 hybridisieren.
14. DNA-Fragmente, Teile, Analoga und Derivate hiervon, die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
15. DNA-Fragment nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es zumindest für einen Teil eines Polypeptids kodiert, welches die Aktivität des menschlichen oder murinen Proteins mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche besitzt.
16. Rekombinanter Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine DNA-Sequenz enthält, die einem Gen oder einem DNA-Fragment entspricht, das für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
17. Rekombinanter Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß er von einem bakteriellen Plasmid, einem Bakteriophagen oder von einem viralen Vektor abgeleitet ist.
18. Wirtszelle, transformiert von einem Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
19. Wirtszelle nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Prokaryontenzelle oder eine Eukaryontenzelle ist.

20. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Fragments nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es das Screenen einer menschlichen oder murinen cDNA-Klonbank unter Verwendung eines DNA-Fragments einer DNA, die für ein murines oder menschliches Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität kodiert, als Sonde umfaßt.
21. Ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der gegen ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen, einem Teil, einem Derivat oder einem Analogon hiervon nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche gerichtet ist.
22. Therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure in einer wirksamen Menge enthält, die mit einem Gen oder einem Teil hiervon hybridisiert, das für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
23. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) die für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil hiervon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) und/oder (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleotidsequenz aus (a), (b) und/oder (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

24. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäure eine gegebenenfalls modifizierte DNA ist.
25. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäure eine gegebenenfalls modifizierte RNA ist.
26. Therapeutisches Mittel,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein Protein, ein Analogon, Derivat oder Teile hiervon nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zusammen mit üblichen Träger- und/oder Hilfsstoffen in einer wirksamen Menge enthält.
27. Verwendung eines Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche als molekulare Sonde in der Diagnostik.
28. Verwendung eines Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression.
29. Verfahren zur Transformation einer Prokaryonten- oder Eukaryontenzelle unter Verwendung einer für ein Protein mit erythropoeseinduzierender Aktivität kodierenden DNA, einem Teil, einem Derivat oder einem Analogon hiervon.
30. Fusionsprotein mit einer Aminosäuresequenz, die in ihrer Gesamtheit oder zum Teil aus der Aminosäuresequenz von menschlichem oder murinem Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen nach

einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche und einem Teil eines prokaryontischen oder eukaryontischen Proteins besteht.

31. Synthetisches Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit einer Aminosäuresequenz, die von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die mit der DNA-Sequenz nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 zumindest unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
32. Verwendung eines Proteins nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche oder der Inhibitoren dieses Proteins zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine lokale oder systemische Über- oder Unterproduktion dieses Proteins auf die Krankheitsentwicklung oder ihren Verlauf einen Einfluß nimmt.

Zusammenfassung

Erfindungsgemäß wird ein neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität, insbesondere für erythropoetische Zellen, offenbart.

(Fig. 1)

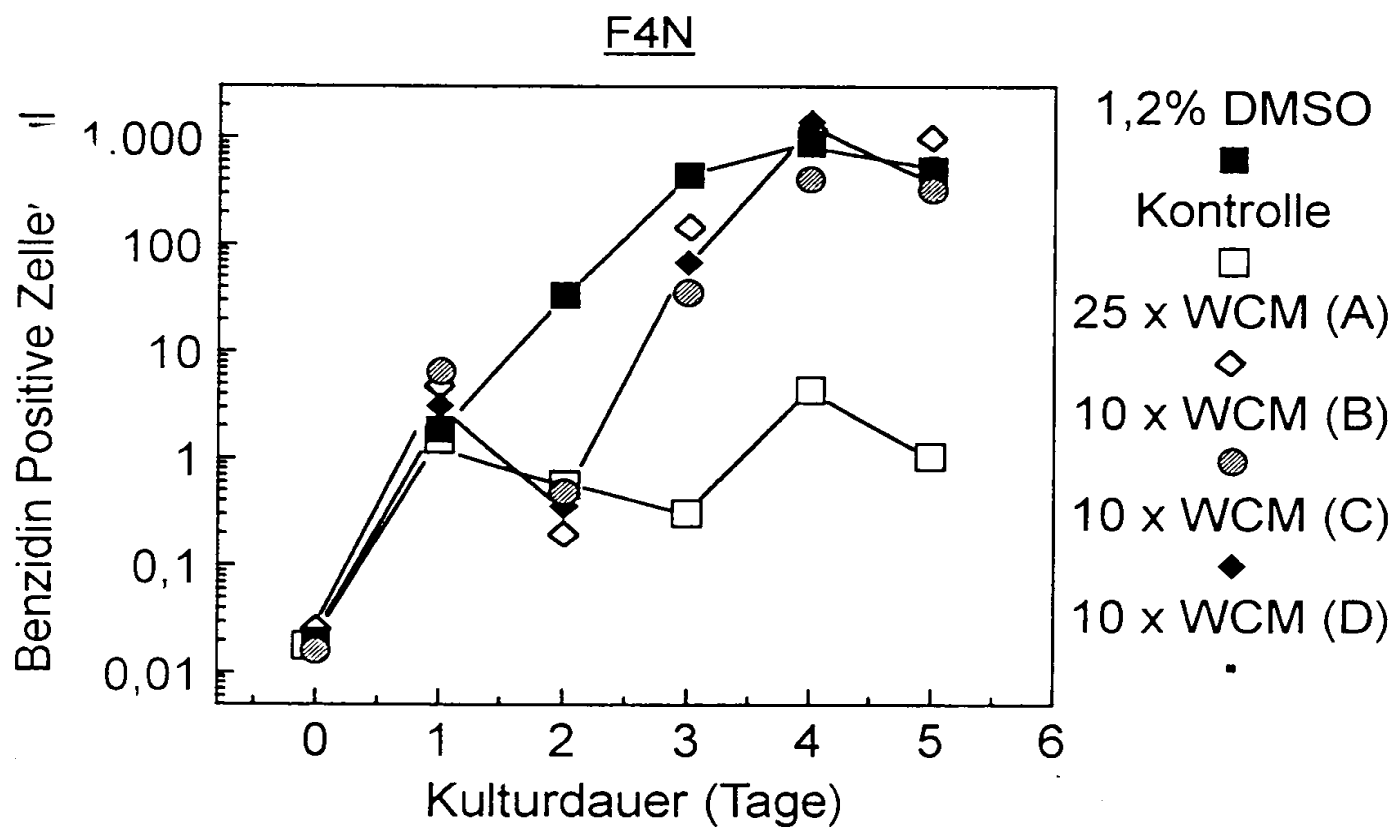


Abb. 1

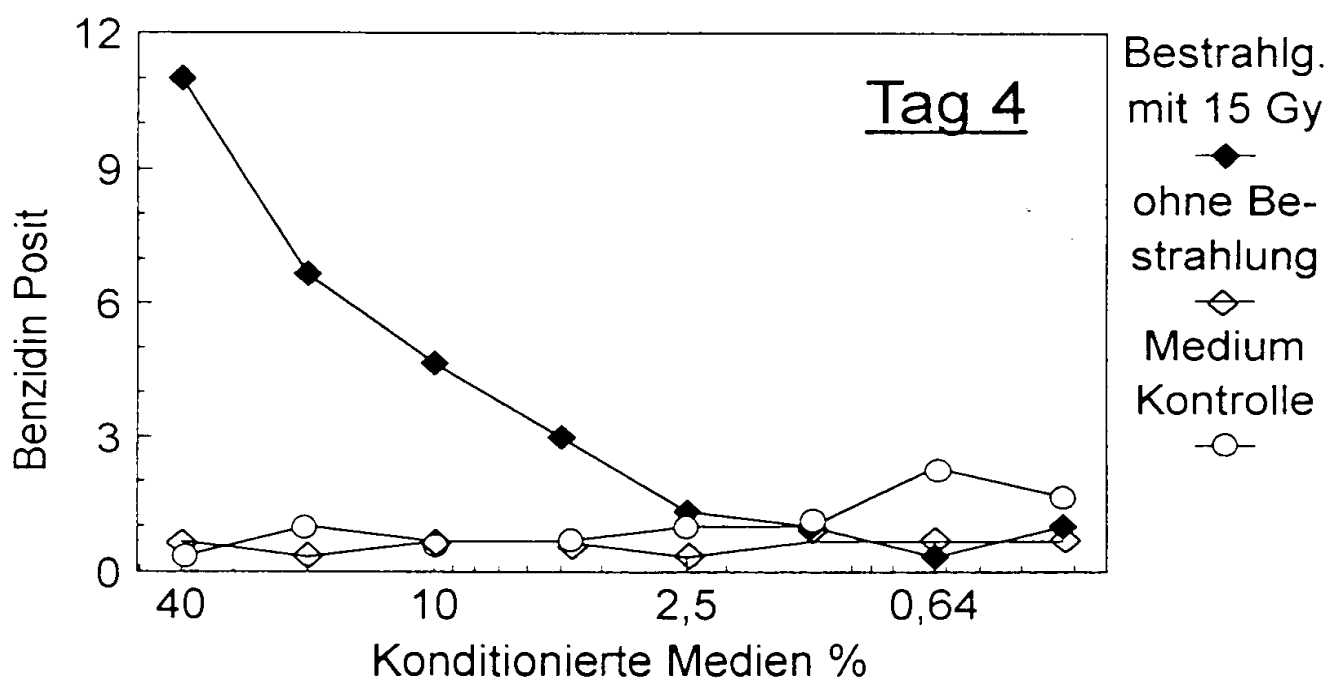
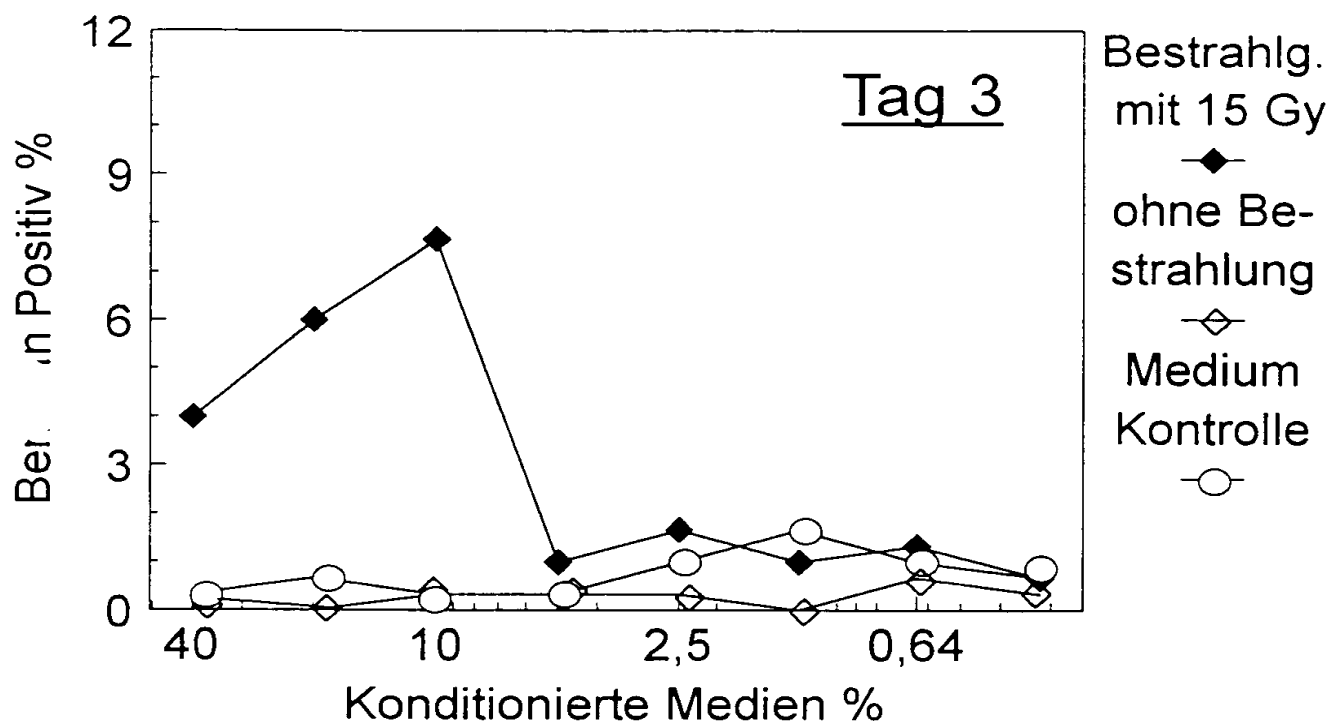


Abb. 2

K 562

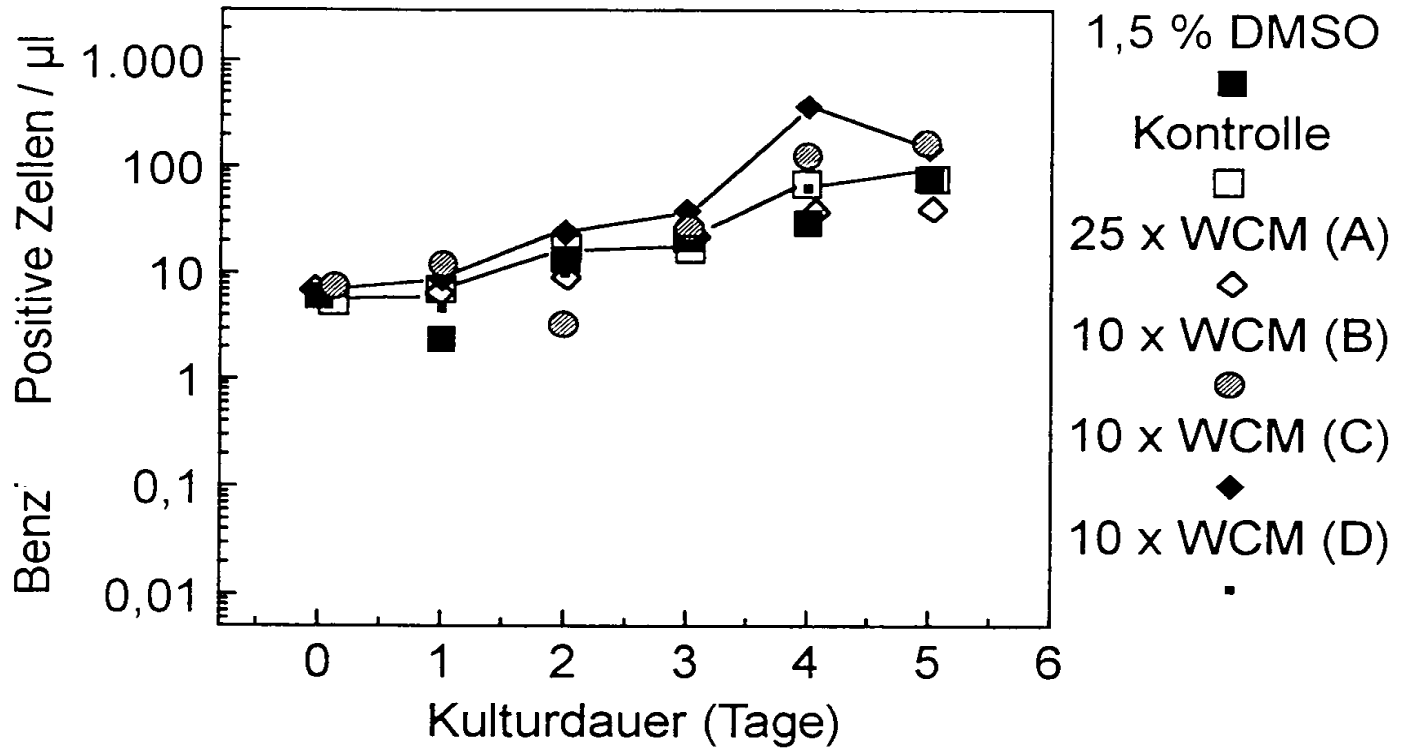
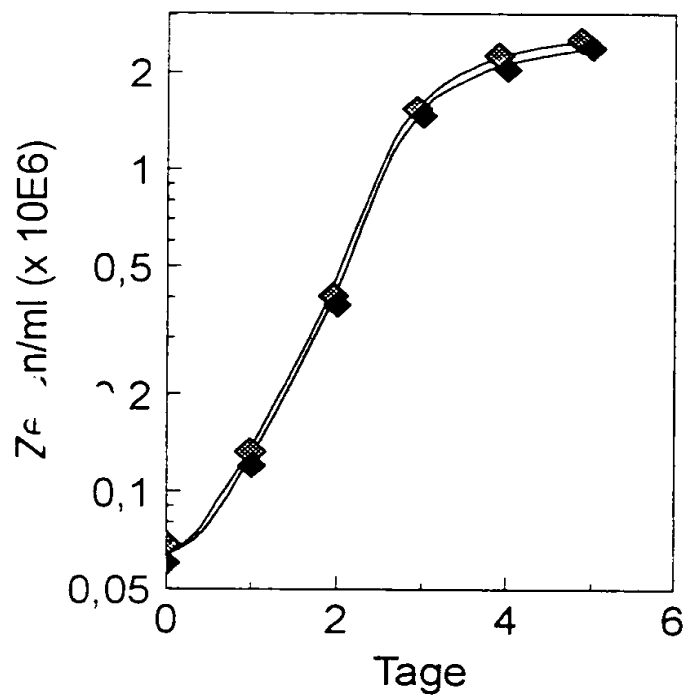
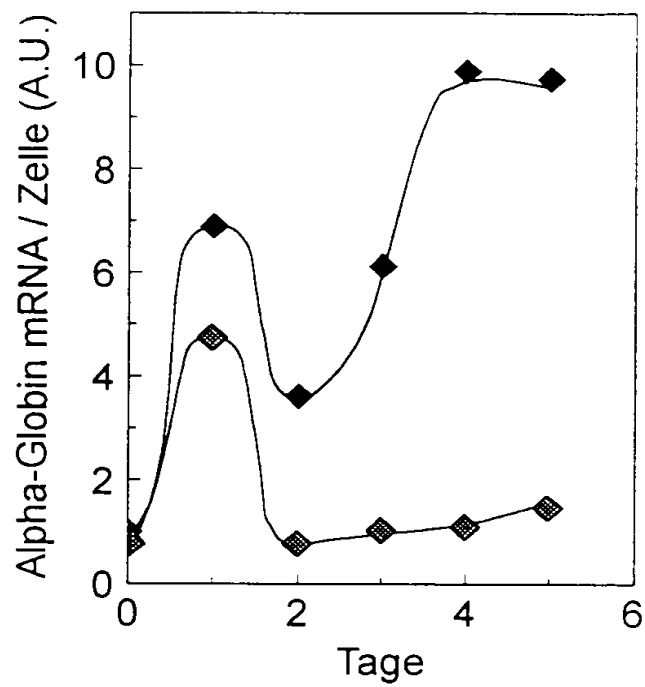


Abb. 3



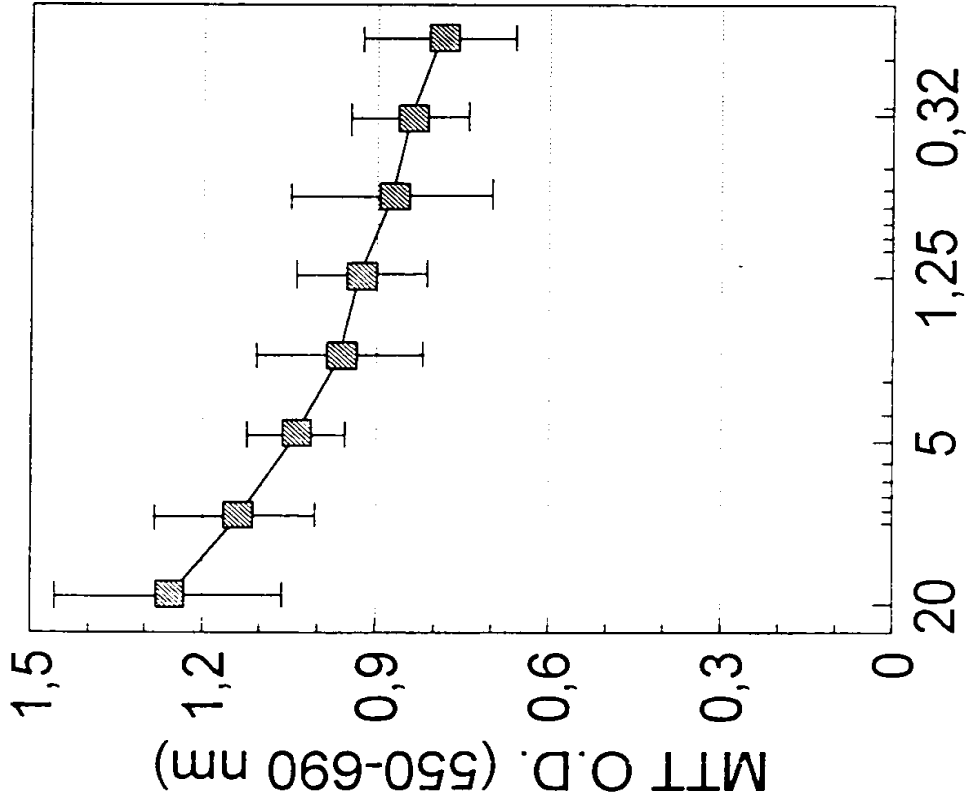
◆ 20% 10 x WCM



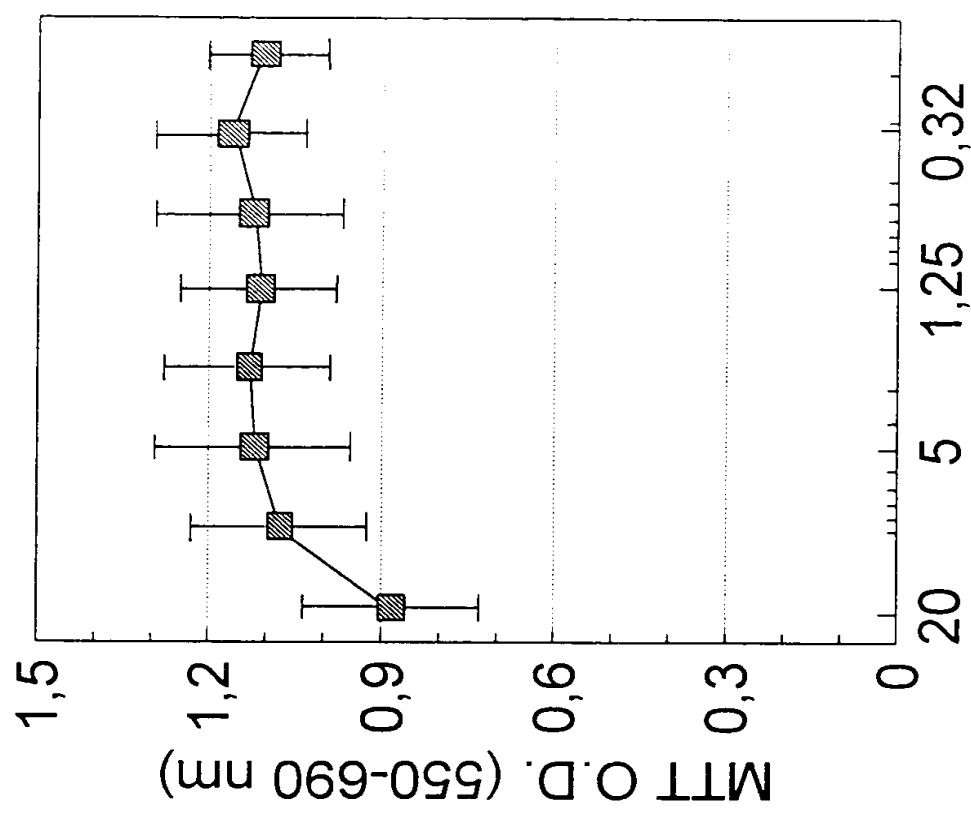
◆ Kontrolle

Abb. 4

Adhärente Fraktion



Nicht-Adhärente Fraktion



10 X WEHI Kond. Medium %

10 X WEHI Kond. Medium %

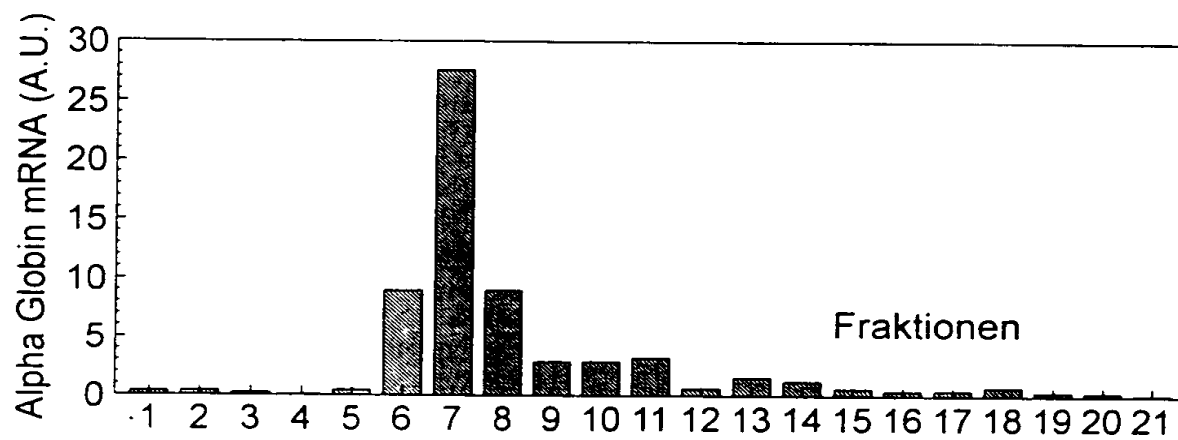
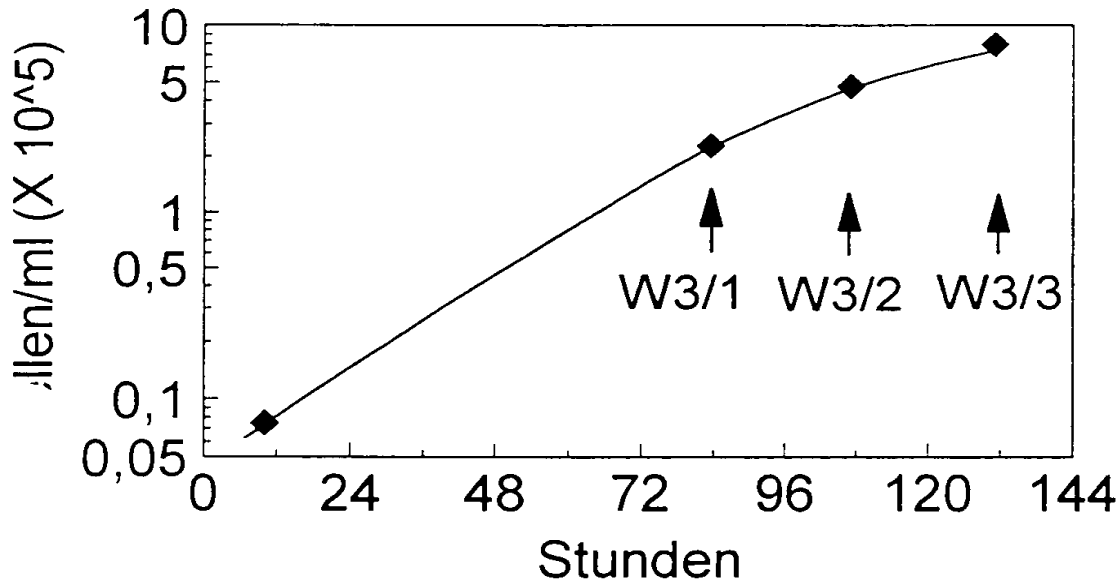


Abb. 6

Zelldichte



Differenzierungsinduktion (B 8/3, Tag 3)

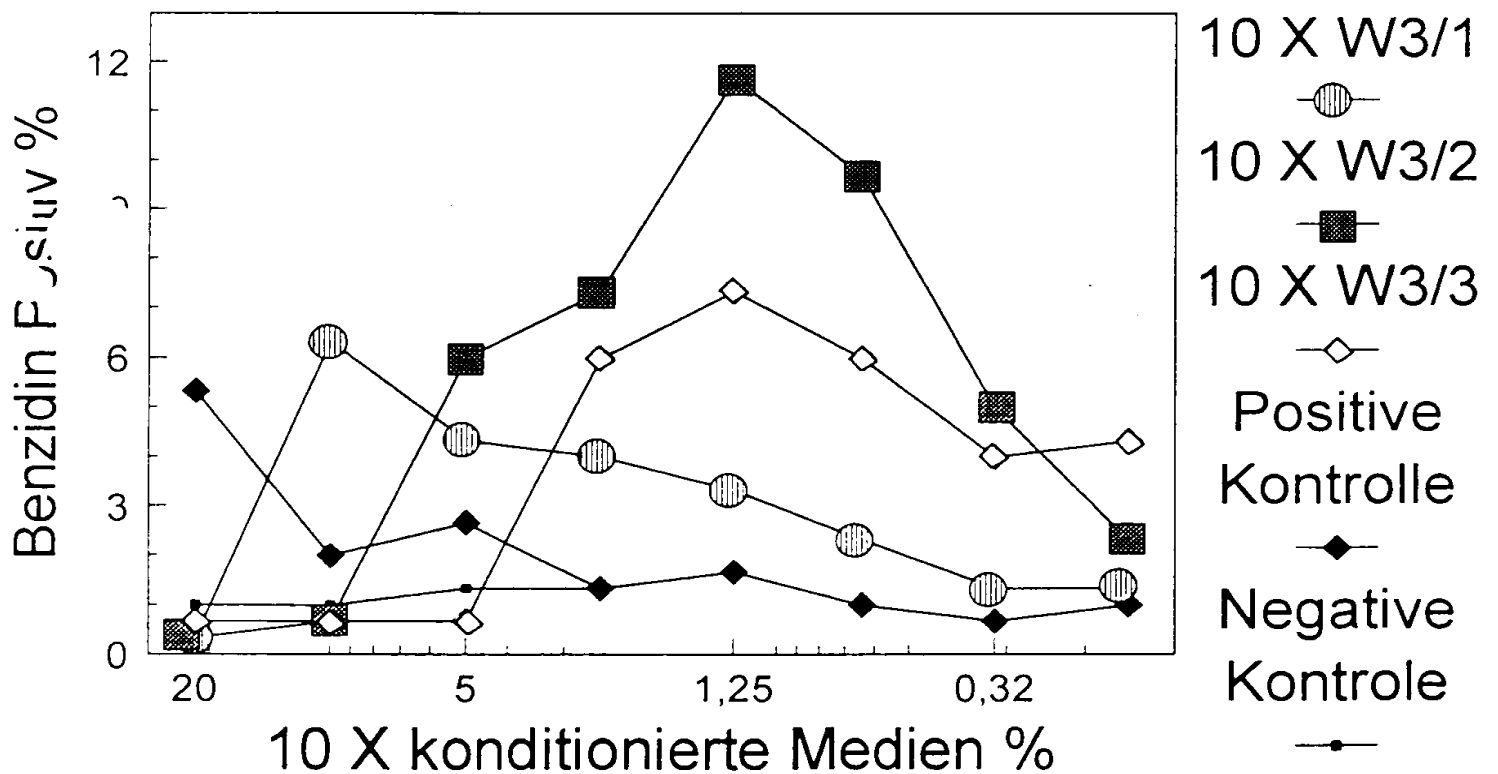


Abb. 7

Abb. 8

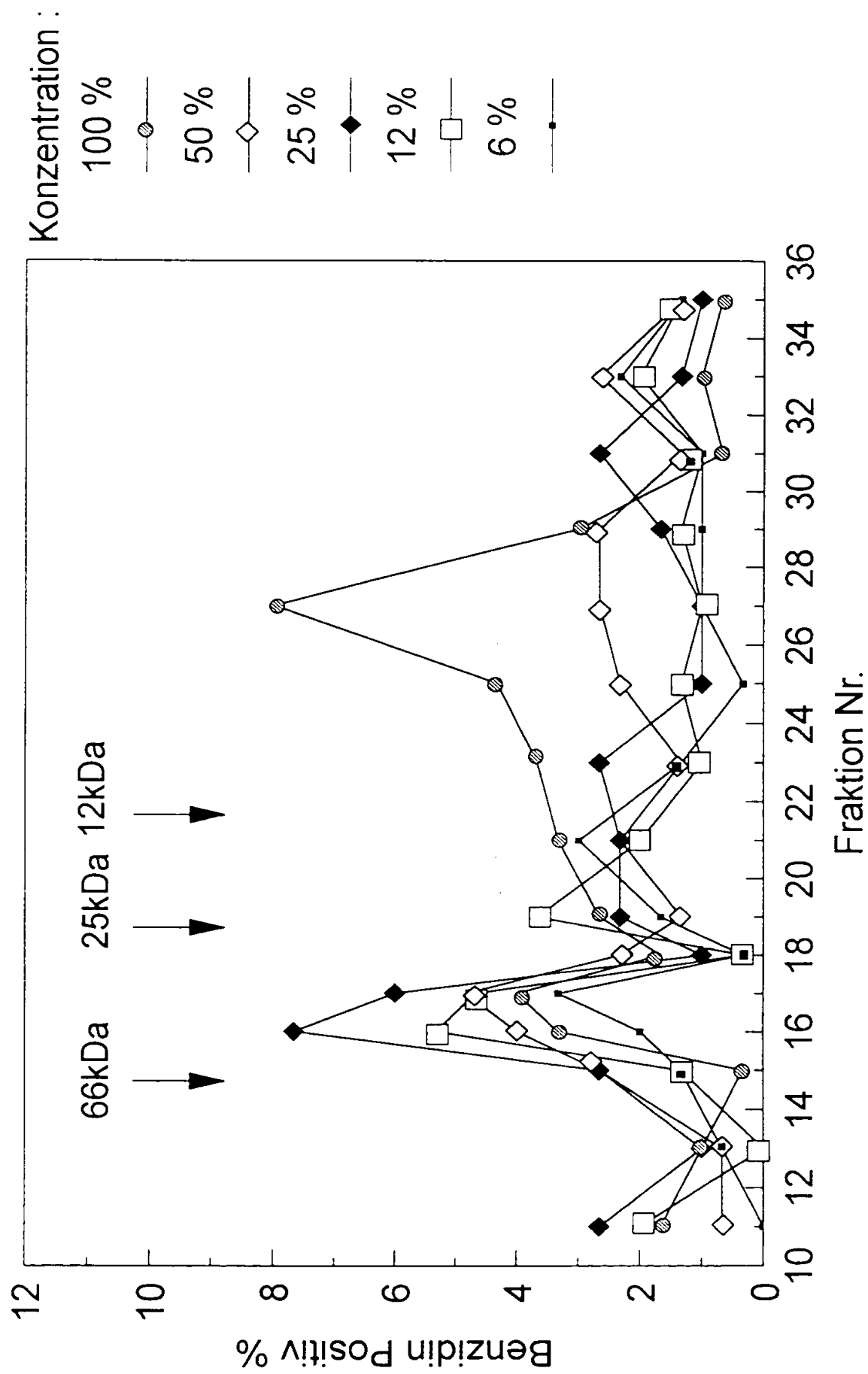
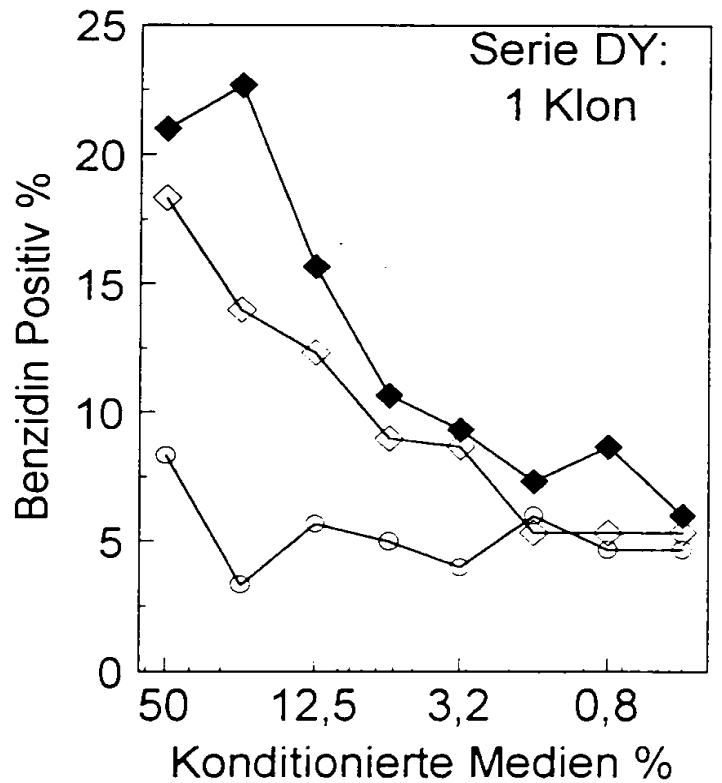
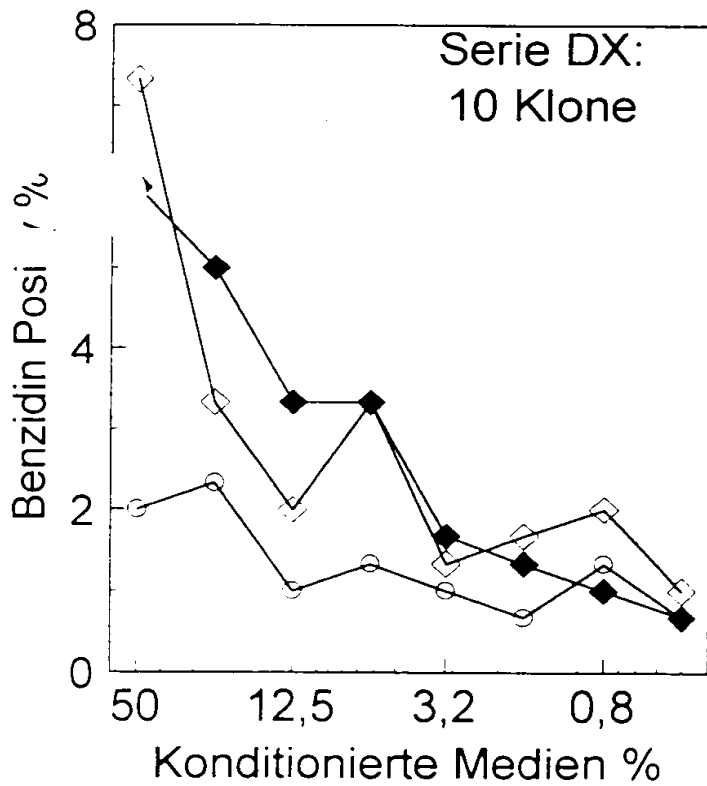
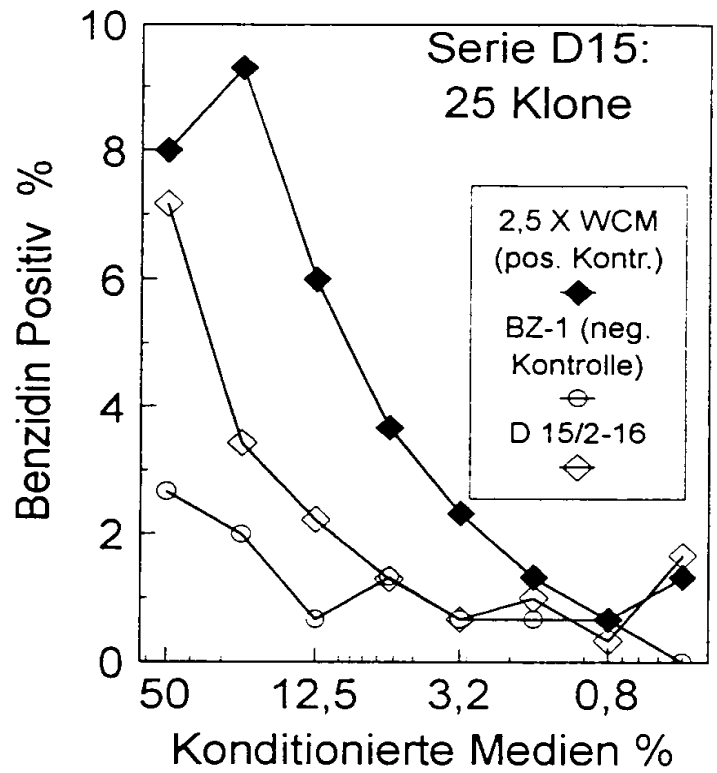
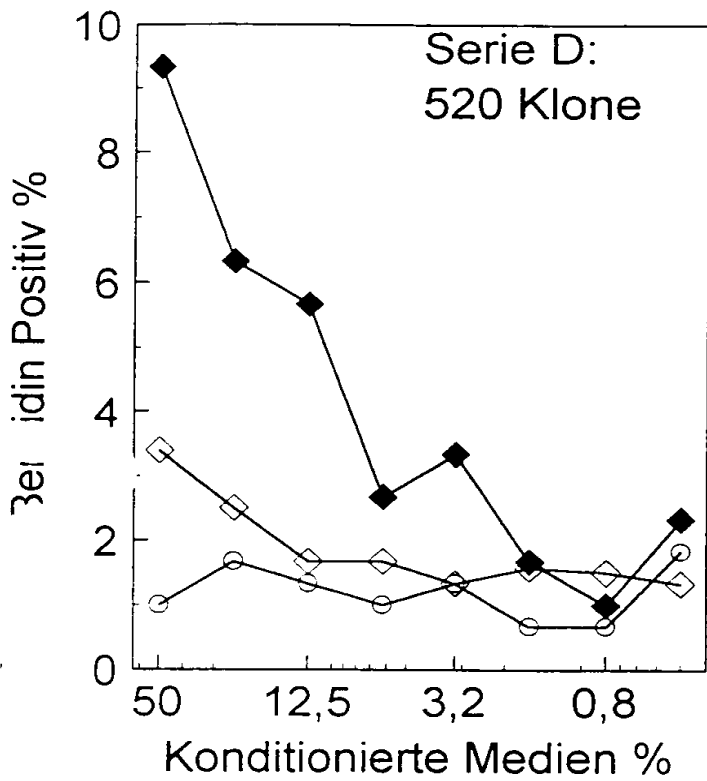


Abb. 9



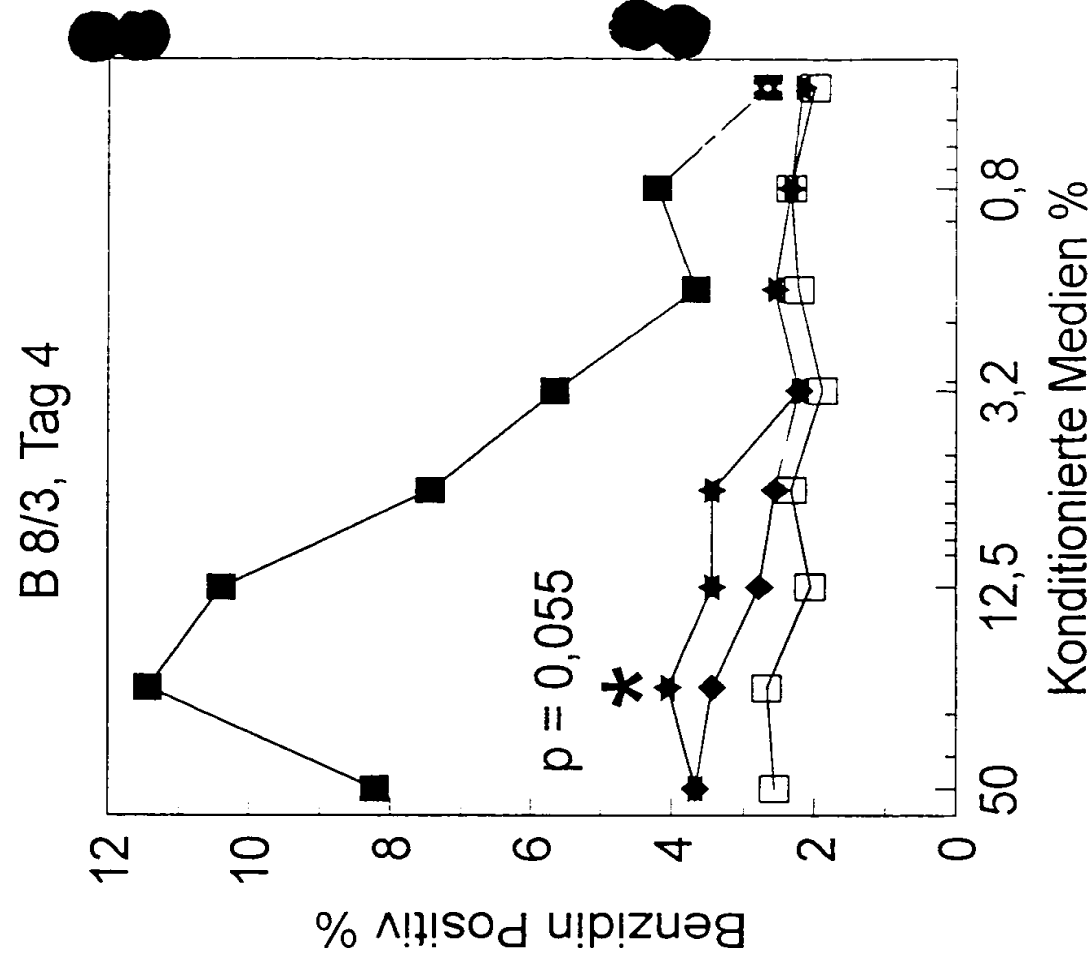
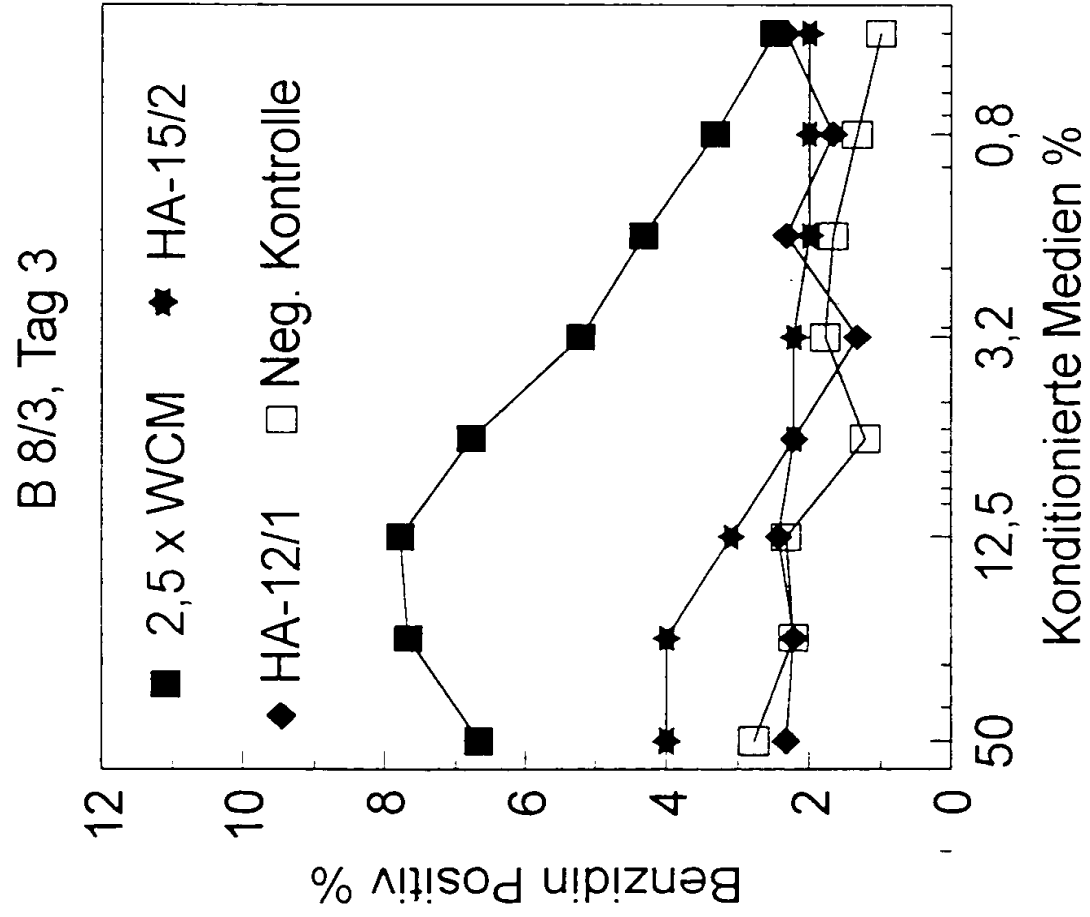


Abb. 10

Abb. 11

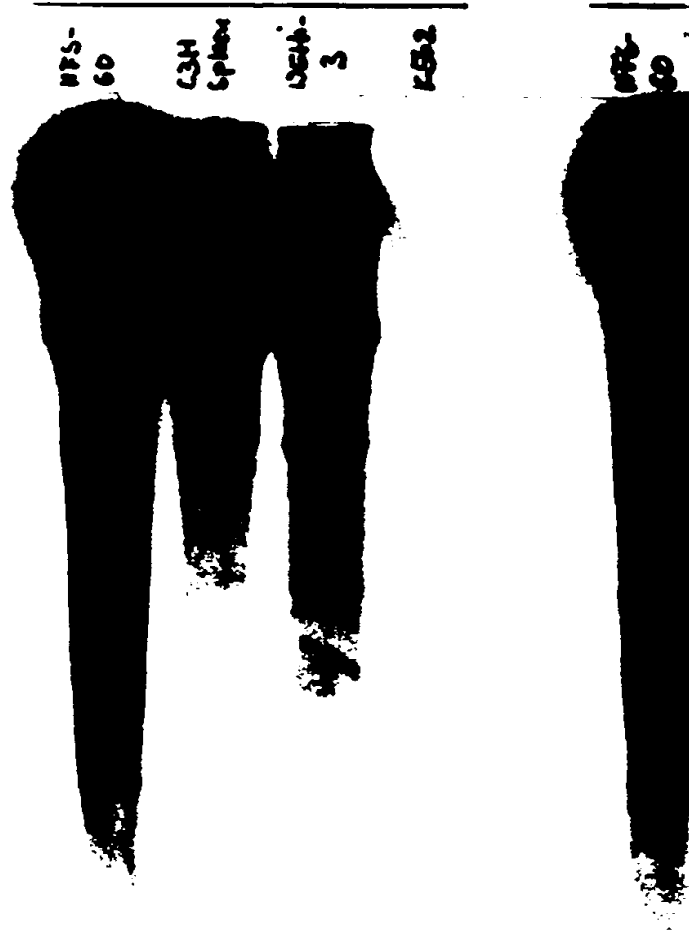


Abb. 12

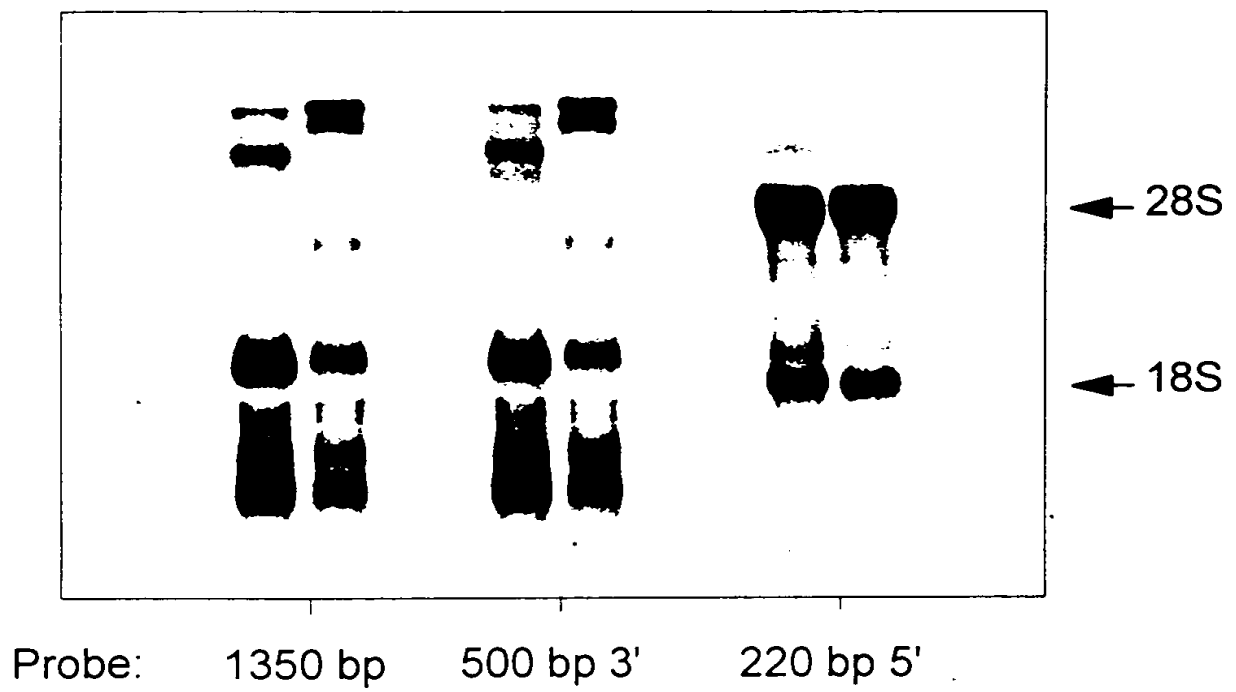


Abb. 13

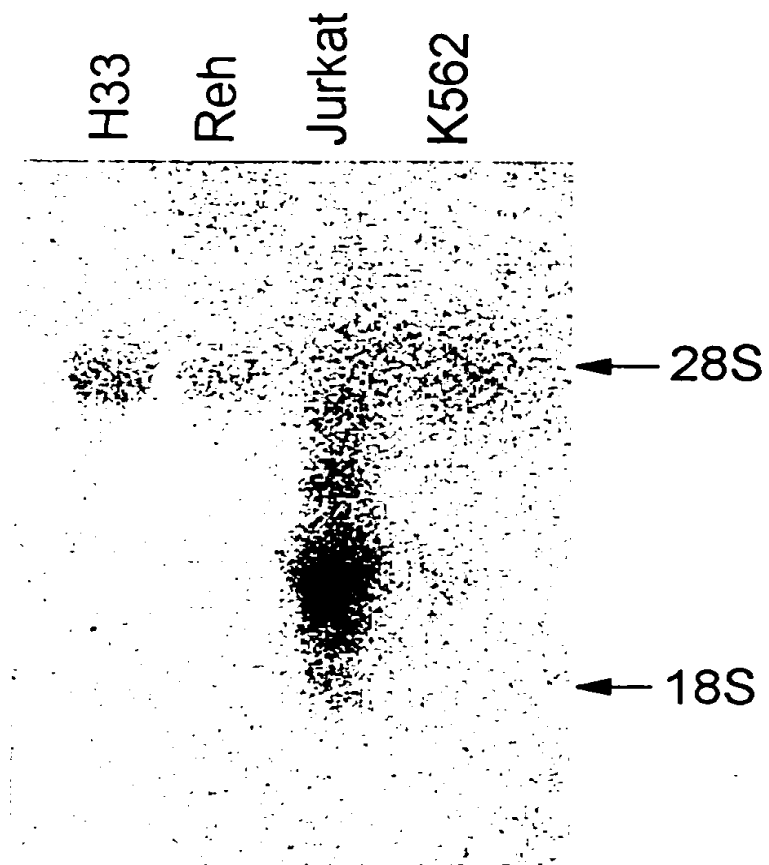
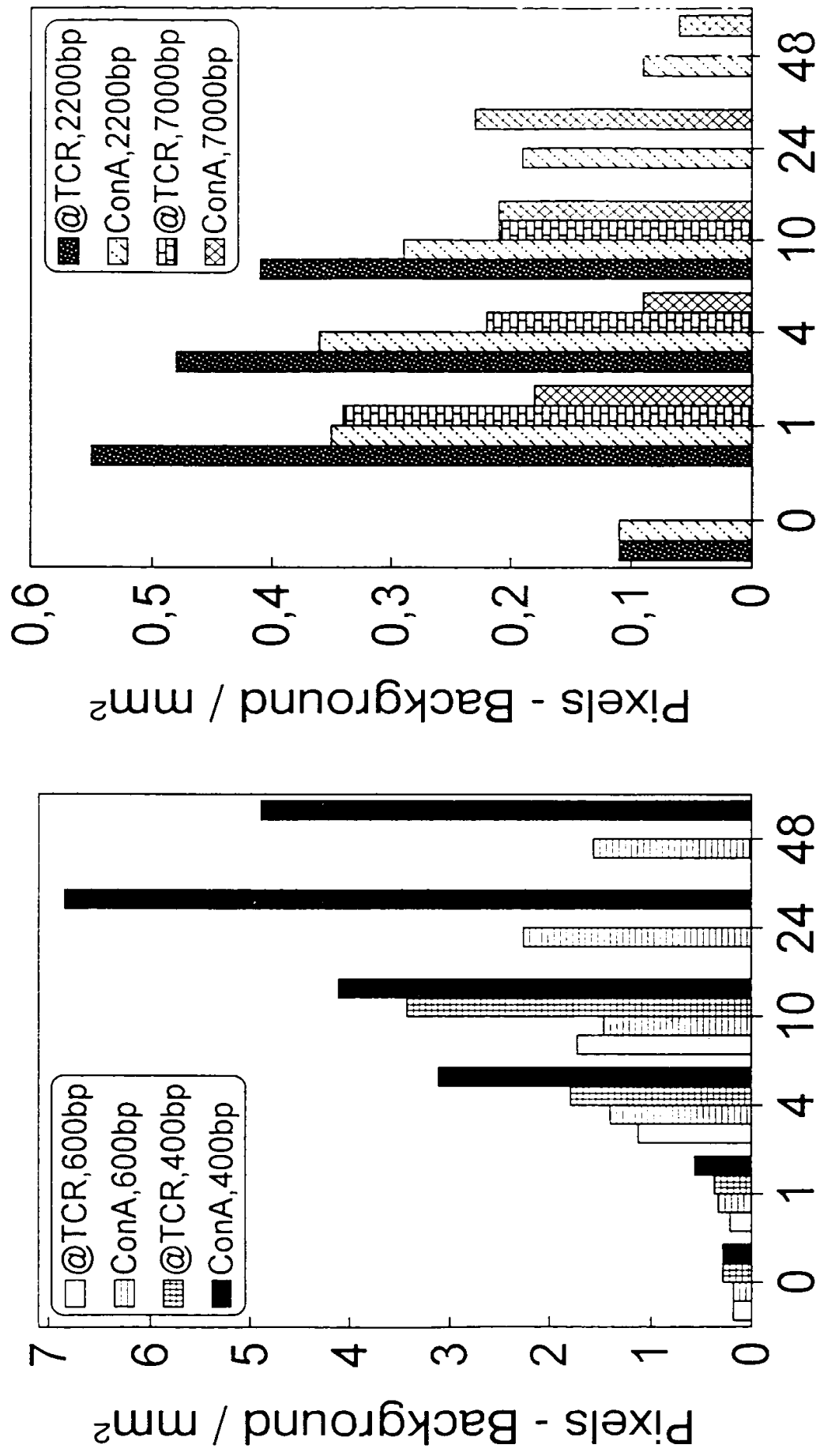
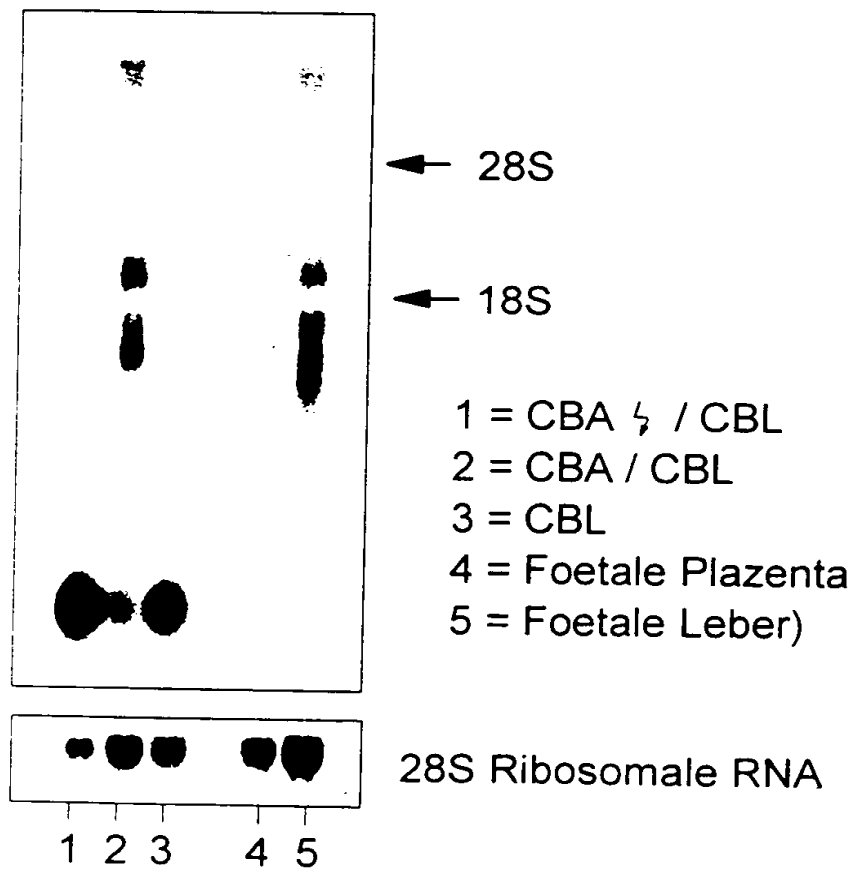


Abb. 14

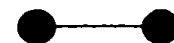
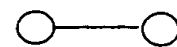


Kulturdauer (Stunden)

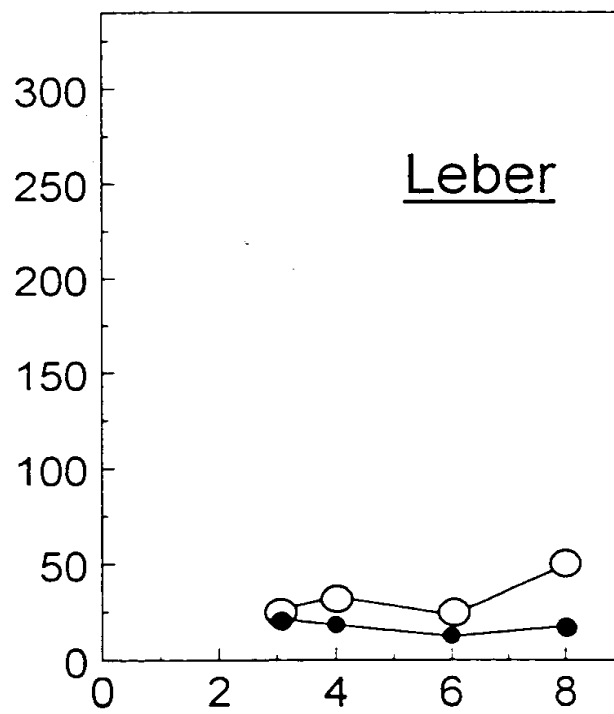
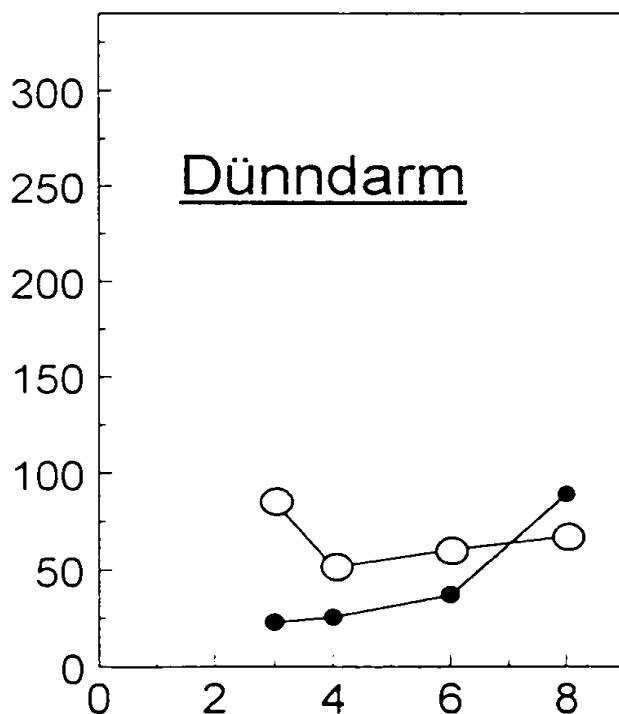
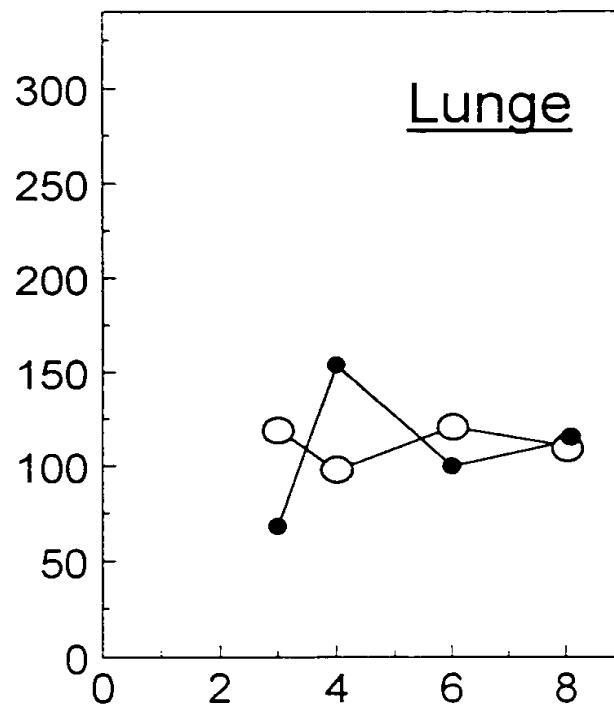
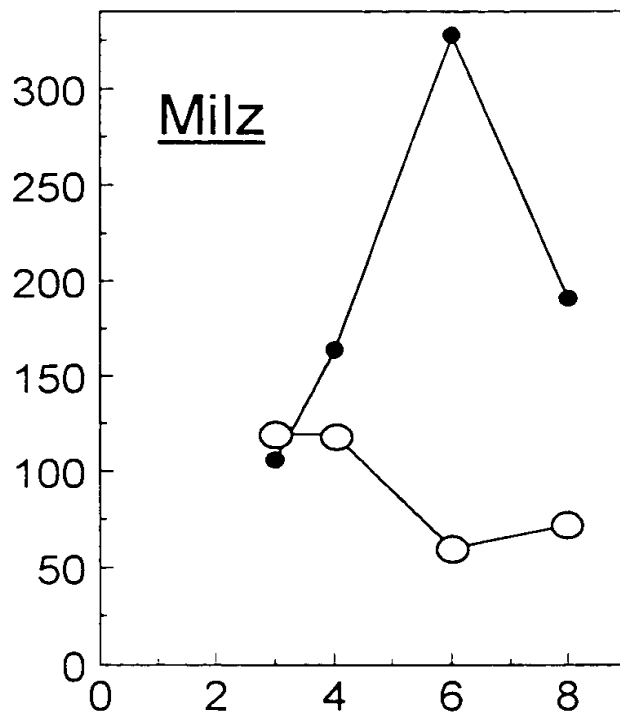
Abb. 15



Transplantation von CBA X CBL
oder CBL Milzzellen



Expression am Tag 0
CBL Milz eda Expr
in % u- CBL Milz eda Expr



Tage nach Transplantation

Abb. 16

1	CCGACCGTGC	GGA	CTTAAGA	TGGAGGCACT	TCCTGTCTGC	GGCGGGAAGA
51	GAAGGCTCGG	TCGGAGCCGG	GAATGCTGGG	ACTTGTAGTG	CGTAGTCAAT	
101	GGTTCTCTAT	GGGCTTTCAG	AGTGAGTGGC	GGGAAGGCGG	CCCCGAGGCA	
151	TGCTGGGAGT	TGTAGTCCTG	CCGTCGTCAA	TGGTTCTCTA	TGGGCTTTCA	
201	GAGTGAGTGG	CGGGAAGGCG	GCCCCGAGGC	ATGCTGGGAG	TTGTAGTCCT	
251	GCCATAGTCA	ATGGTTCTCT	ATGGGCTTTC	AGACTGAGTG	GCGGGAAGGC	
301	GGCCCCGAGG	CATGCTGGGA	GTTGCAGCGC	CATGTTTTAA	AGCACGCGTT	
351	TCTCTGTATA	GACCTGGCTG	TGGATTTTTC	GCTAATTCTT	TTTTTTAGCT	
401	TTATTTTTAA	TTTTTACTTT	TTCACACAGG	ATTCTCTTTT	ATAGCCTTGG	
451	CTACCGTTTT	TTCCCTAATT	ATTCTCCTTT	TCATTTTGGT	TTATTTTTTT	
501	TTAATTTTGG	TTTTTTTAAG	ACAGGGTTTC	TCTGTATAGA	CCTGGCTGTG	
551	GATTTCTCAC	TAATTATTTT	TTTTAGCTTT	ATTTTTAATT	TTTACTTTTT	
601	CACACAGGAT	TTCTCTTTAT	AGCCTTGGCT	ACCGTTTTTT	CCGTAATTAT	
651	TCTTATTTTC	ATTTTGGTTT	ATTTTTTAAT	TTTAATTTTT	GATTTTGGAG	
701	ACAGGGTTTC	TCTTTTAGCC	GCAGCTATGG	TTTCTGCCCT	AATTATTCTT	
751	GTCCTTATTT	GTAATTTAAT	TCTTAATTTA	ATTTAATTTA	TAATTTTGTT	
801	GTAAGTTTTT	CTGTGGGCGT	GAATGGAAAG	TCTAACCCGT	GTTTCTCTGT	
851	TCAGCGTCCG	CCGGTCACGG	CCGCCGCCCC	CAGCGACGTC	ACCCACACGC	
901	GCAGAAGCGG	ACGCCGCGGT	CAAGATGTCT	CTGCCATGCC	CACGGGACGC	
951	ACGGACGCAC	GGACGGACGG	ACGGACTCCA	CAAGGTAGGA	AGCCTGCGCC	
1001	GACCGCACCG	CCGCACCCAC	CACAGCACAC	AGGACACACG	CGGGCCCCCG	
1051	GCCCCGCCAG	GCACACGCGG	CACACACGGC	ACACACGGCA	GGCAGGCCAG	
1101	GCACACGCAT	CCGCAGGACC	CGCCGCACCC	GCCACGCAGA	CACGGACGAG	
1151	CCGCCGCGGT	CAAGATGTTT	ACCCGCCGCG	GTCAAGATGT	ATGTGCCACC	
1201	GACCCTCGCC	CCGCTGGACG	GACGGACGGA	CGCACGCACG	CCGTCAGCGT	
1251	CCACCGGTCA	CTGCCGCCGC	CCACAGTGAT	GTCACCCACG	AAAGCACACA	
1301	CGTAGAAGCG	GACGCCGTGG	TCAAGATGTC	TCTGCCATCC	CCACAGGACG	
1351	GACGGACGGA	CTCCACAAGG	TGCGCGTGTC	GCCGAGGCCG	CCAGGACGGA	
1401	GCGATTCTCA	CGGAGGAAGG	AGCACGCCAA	CAGGGCCTGA	CTGCGTACAG	
1451	ACATGTCCCC	CTCAATAAAA	TTGCAGTTGA	AATGGAAAAA	AAAAA	

Abb. 17

Vorläufige Sequenz der *eda* 2.2 kbp cDNA

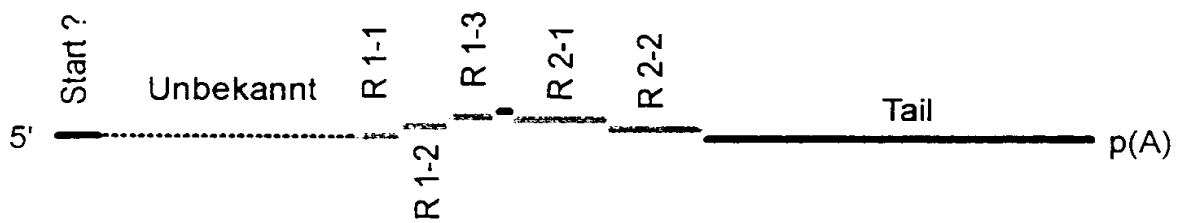


Abb. 18

1 CGCGCCCGCC CGGGATCCCC AGCTGCCGCC GCGCCCGCCC GCCCGCCCGG
51 GGCCCCCGCT GCAGAACCGT GACCGTCCGC CGGTCACGGC CGCCGCCCCC
101 AGCGACGTCA CCCACACGCG CAGAAGCGGA CGCCGCGGTC AAGATGTCTC
151 TGCCATGCCC ACGGGACGCA CGGACGCACG GACGGACGGA CTGACTCCAC
201 AAGGTAGGAA GCCTGCGCCG ACCGCACCGC CGCACCCACC ACAGCACACA
251 GGACACACGC GGGCCCCGCG CCCGCCCAGG CACACGCGGC ACACACGGCA
301 CACACGGCAG GCAGGCCAGG CACACGCATC CGCAGGACCC GCCGCACCCG
351 CCACGCAGAC ACGGACGAGC CGCCGCGGTC AAGATGTTCA CCCGCCGCGG
401 TCAAGATGTA TGTGCCACCG ACCCTCGCCC CGCTGGACGG ACGGACGGAC
451 GCGCGCACGC CGTCAGCGTC CACCGGTCAC TGCCGCCGCC CACAGTGACG
501 TCACCCACGA AAGCACACAC GTAGAAGCGG ACGCCGTGGT CAAGATGTCT
551 CTGCCATCCC CACAGGACGG ACGGACGGAC TCCACAAGGT GCGCGTGTCT
601 CCGAGGCCGC CAGGATGGAG CGATTCTCAC GGAGGAAGGA GCACGCCAAC
651 AGGGCCTGAC TGCCTACAGA AATGCCCCC CTCAATAAAA TTGCAGTTGA
701 AATGGAAAAA AAAAA

Abb. 19

REINHARD · SKUHRA · WEISE & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

An das
Deutsche Patentamt
Zweibrückenstr. 12

80297 München

DR. ERNST STURM
DR. HORST REINHARD
DIPLOM-ING. UDO SKUHRA
DIPLOM-ING. REINHARD WEISE
DR. WERNER BEHNISCH

FRIEDRICHSTRASSE 31
D-80801 MÜNCHEN

POSTFACH 440151
D-80750 MÜNCHEN

TELEFON: 089 3816100
TELEX: 5212939 sar d
TELEFAX: 089 3401479

Ihr Zeichen: your ref.

Unser Zeichen: our ref.

Datum: date

P7996
Dr.B/cl

28. März 1996

Neue Patentanmeldung

"Neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für erythropoetische Zellen"

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH

Das beiliegende Sequenzprotokoll wurde mit der im Sequenzprotokoll angegebenen Software erstellt. Bei den Angaben zu SEQ ID NO:3 ist die Länge des Proteins mit 178 Aminosäuren angegeben. Die tatsächliche Länge der Aminosäurekette beträgt jedoch 177 Aminosäuren, wie aus dem Sequenzprotokoll zu ersehen ist. Dieser Fehler scheint softwareimmanent zu sein und konnte trotz mehrfacher Versuche leider nicht behoben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die tatsächliche Länge der Aminosäurekette demnach 177 Aminosäuren beträgt.

U. Behnisch

Dr. Werner Behnisch
Patentanwalt

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: GSF Forschungszentrum fuer Umwelt und
Gesundheit GmbH
- (B) STRASSE: Ingolstaedter Landstr. 1
- (C) ORT: Oberschleissheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85764

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues Protein mit
differenzierungsinduzierender Aktivitaet

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1495 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCGACCGTGC	GGACTTAAGA	TGGAGGCACT	TCCTGTCTGC	GGCGGGAAGA	GAAGGCTCGG	60
TCGGAGCCGG	GAATGCTGGG	ACTTGTAGTG	CGTAGTCAAT	GGTTCTCTAT	GGGCTTTCAG	120
AGTGAGTGGC	GGGAAGGCGG	CCCCGAGGCA	TGCTGGGAGT	TGTAGTCCTG	CCGTCGTCAA	180
TGGTTCTCTA	TGGGCTTTCA	GAGTGAGTGG	CGGGAAGGCG	GCCCCGAGGC	ATGCTGGGAG	240
TTGTAGTCCT	GCCATAGTCA	ATGGTTCTCT	ATGGGCTTTC	AGACTGAGTG	GCGGGAAGGC	300
GGCCCCGAGG	CATGCTGGGA	GTTGCAGCGC	CATGTTTTAA	AGCACGCGTT	TCTCTGTATA	360
GACCTGGCTG	TGGATTTTTT	GCTAATTCTT	TTTTTTAGCT	TTATTTTTAA	TTTTTACTTT	420
TTCACACAGG	ATTTCTCTTT	ATAGCCTTGG	CTACCGTTTT	TTCCCTAATT	ATTCTCCTTT	480
TCATTTTGGT	TTATTTTTTT	TTAATTTTGG	TTTTTTTAAG	ACAGGGTTTC	TCTGTATAGA	540
CCTGGCTGTG	GATTTCTCAC	TAATTATTTT	TTTLAGCTTT	ATTTTAAATT	TTTACTTTTT	600
CACACAGGAT	TTCTCTTTAT	AGCCTTGGCT	ACCGTTTTTT	CCGTAATTAT	TCTTATTTTC	660
ATTTTGTTTT	ATTTTTTAAT	TTTAATTTTT	GATTTTGGAG	ACAGGGTTTC	TCTTTTAGCC	720
GCAGCTATGG	TTTCTGCCCT	AATTATTCTT	GTCCTTATTT	GTAATTTAAT	TCTTAATTTA	780
ATTTAATTTA	TAATTTTGTT	GTAAGTTTTT	CTGTGGGCGT	GAATGGAAAG	TCTAACCCGT	840
GTTTCTCTGT	TCAGCGTCCG	CCGGTCACGG	CCGCCGCCCC	CAGCGACGTC	ACCCACACGC	900
GCAGAAGCGG	ACGCCGCGGT	CAAGATGTCT	CTGCCATGCC	CACGGGACGC	ACGGACGCAC	960
GGACGGACGG	ACGGACTCCA	CAAGGTAGGA	AGCCTGCGCC	GACCGCACCG	CCGCACCCAC	1020
CACAGCACAC	AGGACACACG	CGGGCCCCGC	GCCCCGCCAG	GCACACGCGG	CACACACGGC	1080
ACACACGGCA	GGCAGGCCAG	GCACACGCAT	CCGCAGGACC	CGCCGCACCC	GCCACGCAGA	1140
CACGGACGAG	CCGCCGCGGT	CAAGATGTTC	ACCCGCCGCG	GTCAAGATGT	ATGTGCCACC	1200
GACCCTCGCC	CCGCTGGACG	GACGGACGGA	CGCACGCACG	CCGTCAGCGT	CCACCGGTCA	1260
CTGCCGCCGC	CCACAGTGAT	GTCACCCACG	AAAGCACACA	CGTAGAAGCG	GACGCCGTGG	1320
TCAAGATGTC	TCTGCCATCC	CCACAGGACG	GACGGACGGA	CTCCACAAGG	TGCGCGTGTC	1380

GCCGAGGCCG CCAGGACGGA GCGATTCTCA CGGAGGAAGG AGCACGCCAA CAGGGCCTGA 1440

CTGCGTACAG ACATGTCCCC CTCAATAAAA TTGCAGTTGA AATGGAAAAA AAAAA 1495

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 715 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 155..688

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGCGCCCGCC CGGGATCCCC AGCTGCCGCC GCGCCCGCCC GCCCGCCCGG GGCCCCCGCT 60

GCAGAACCGT GACCGTCCGC CGGTCACGGC CGCCGCCCCC AGCGACGTCA CCCACACGCG 120

CAGAAGCGGA CGCCGCGGTC AAGATGTCTC TGCC ATG CCC ACG GGA CGC ACG 172

Met Pro Thr Gly Arg Thr

1

5

GAC GCA CGG ACG GAC GGA CTG ACT CCA CAA GGT AGG AAG CCT GCG CCG 220

Asp Ala Arg Thr Asp Gly Leu Thr Pro Gln Gly Arg Lys Pro Ala Pro

10

15

20

ACC GCA CCG CCG CAC CCA CCA CAG CAC ACA GGA CAC ACG CGG GCC CCG 268

Thr Ala Pro Pro His Pro Pro Gln His Thr Gly His Thr Arg Ala Pro

25

30

35

CGC CCG CCC AGG CAC ACG CGG CAC ACA CGG CAC ACA CGG CAG GCA GGC 316

Arg Pro Pro Arg His Thr Arg His Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Gly

40

45

50

CAG GCA CAC GCA TCC GCA GGA CCC GCC GCA CCC GCC ACG CAG ACA CGG 364

Gln	Ala	His	Ala	Ser	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Thr	Gln	Thr	Arg				
55					60					65					70				
ACG	AGC	CGC	CGC	GGT	CAA	GAT	GTT	CAC	CCG	CCG	CGG	TCA	AGA	TGT	ATG				412
Thr	Ser	Arg	Arg	Gly	Gln	Asp	Val	His	Pro	Pro	Arg	Ser	Arg	Cys	Met				
				75					80					85					
TGC	CAC	CGA	CCC	TCG	CCC	CGC	TGG	ACG	GAC	GGA	CGG	ACG	CGC	GCA	CGC				460
Cys	His	Arg	Pro	Ser	Pro	Arg	Trp	Thr	Asp	Gly	Arg	Thr	Arg	Ala	Arg				
			90					95					100						
CGT	CAG	CGT	CCA	CCG	GTC	ACT	GCC	GCC	GCC	CAC	AGT	GAC	GTC	ACC	CAC				508
Arg	Gln	Arg	Pro	Pro	Val	Thr	Ala	Ala	Ala	His	Ser	Asp	Val	Thr	His				
			105				110						115						
GAA	AGC	ACA	CAC	GTA	GAA	GCG	GAC	GCC	GTG	GTC	AAG	ATG	TCT	CTG	CCA				556
Glu	Ser	Thr	His	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Val	Lys	Met	Ser	Leu	Pro				
	120				125						130								
TCC	CCA	CAG	GAC	GGA	CGG	ACG	GAC	TCC	ACA	AGG	TGC	GCG	TGT	CGC	CGA				604
Ser	Pro	Gln	Asp	Gly	Arg	Thr	Asp	Ser	Thr	Arg	Cys	Ala	Cys	Arg	Arg				
135				140						145				150					
GGC	CGC	CAG	GAT	GGA	GCG	ATT	CTC	ACG	GAG	GAA	GGA	GCA	CGC	CAA	CAG				652
Gly	Arg	Gln	Asp	Gly	Ala	Ile	Leu	Thr	Glu	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Gln				
				155				160					165						
GGC	CTG	ACT	GCG	TAC	AGA	AAT	GCC	CCC	CCT	CAA	TAA	AATTGCAGTT							698
Gly	Leu	Thr	Ala	Tyr	Arg	Asn	Ala	Pro	Pro	Gln	*								
			170				175												
GAAATGGAAA	AAAAAAA																		715

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 178 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Pro Thr Gly Arg Thr Asp Ala Arg Thr Asp Gly Leu Thr Pro Gln

5

1

5

10

15

Gly Arg Lys Pro Ala Pro Thr Ala Pro Pro His Pro Pro Gln His Thr
20 25 30

Gly His Thr Arg Ala Pro Arg Pro Pro Arg His Thr Arg His Thr Arg
35 40 45

His Thr Arg Gln Ala Gly Gln Ala His Ala Ser Ala Gly Pro Ala Ala
50 55 60

Pro Ala Thr Gln Thr Arg Thr Ser Arg Arg Gly Gln Asp Val His Pro
65 70 75 80

Pro Arg Ser Arg Cys Met Cys His Arg Pro Ser Pro Arg Trp Thr Asp
85 90 95

Gly Arg Thr Arg Ala Arg Arg Gln Arg Pro Pro Val Thr Ala Ala Ala
100 105 110

His Ser Asp Val Thr His Glu Ser Thr His Val Glu Ala Asp Ala Val
115 120 125

Val Lys Met Ser Leu Pro Ser Pro Gln Asp Gly Arg Thr Asp Ser Thr
130 135 140

Arg Cys Ala Cys Arg Arg Gly Arg Gln Asp Gly Ala Ile Leu Thr Glu
145 150 155 160

Glu Gly Ala Arg Gln Gln Gly Leu Thr Ala Tyr Arg Asn Ala Pro Pro
165 170 175

Gln *

